

EIN VERGLEICH
MEHRERER METHODEN ZUR MESSUNG
DER PHAGOZYTÖSEAKTIVITÄT
VON GRANULOZYTEN DES SCHWEINES

Michael Winter

Disbui. München

1987





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554822_0102

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions- und Seuchenmedizin
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. A.Mayr
Arbeit angefertigt unter der Leitung von:
Prof. Dr. H.G. Buschmann

EIN VERGLEICH MEHRERER METHODEN
ZUR MESSUNG DER PHAGOZYTSEAKTIVITÄT
VON GRANULOZYTEN DES SCHWEINES

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Michael Winter
aus
Schwabmünchen

München 1987

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Zucker

Referent: Prof. Dr. H.G. Buschmann

Korreferent: Prof. Dr. H. Kraft

Tag der Promotion: 24. Juli 1987

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung

2. Aufgabenstellung

2.1. Die Aufgabenstellung des Projekts

2.2. Zielsetzung des Projekts

2.3. Projektorganisation und -struktur

2.4. Projektziele

2.5. Projektorganisation

2.6. Projektstruktur

2.7. Projektziele

Meinen Eltern in großer Dankbarkeit

3.1. Aufgabenstellung des Projekts

3.2. Zielsetzung des Projekts

3.3. Projektorganisation und -struktur

3.4. Projektziele

3.5. Projektorganisation

3.6. Projektstruktur

3.7. Projektziele

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
2.	LITERATURÜBERSICHT	2
2.1.	Phylogenese des Immunsystems	2
2.2.	Zellen des Immunsystems	4
2.3.	Phagozytose als ein mehrstufiges Geschehen	6
2.3.1.	Opsonierung	7
2.3.2.	Chemotaxis	8
2.3.3.	Adhärenz	9
2.3.4.	Ingestion	12
2.3.5.	Abtötung und Digestion	15
2.4.	Möglichkeiten der Phagozytosemessung	23
2.4.1.	Chemilumineszenz	24
2.4.2.	Reduktion von Nitroblau-Tetrazolium (NBT)	27
2.4.3.	Stimulierung des Glucose-1-14-C Stoffwechsels	28
2.4.4.	Abtötung von Hefezellen	29
2.4.5.	Flow-Cytometrie	29

3. MATERIAL UND METHODEN	31
3.1. Verzeichnis der verwendeten Materialien	31
3.2. Isolierung von Zellen	33
3.2.1. Gewinnung von Schweineleukozyten	33
3.2.2. Isolierung von Granulozyten	34
3.2.3. Isolierung von Lymphozyten	34
3.2.4. Isolierung von Thrombozyten	35
3.3. Präparation der Phagozytosestimulantien	36
3.3.1. Mikroorganismen	
3.3.1.1. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	36
3.3.1.2. Fluoreszenzmarkierung von <i>Staphylococcus epidermidis</i>	36
3.3.1.3. Fluoreszenzmarkierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	37
3.3.2. Präparation und Opsonierung von Zymosan	38
3.4. Bestimmung des Differentialblutbildes und der Vitalität der Zellen mittels Flow-Cytometrie	39
3.5. Methoden der Phagozytosemessung	40
3.5.1. Chemilumineszenz	40
3.5.2. Reduktion von Nitroblau-Tetrazolium	41
3.5.3. Stimulierung des Glucose-1-14-C Stoffwechsels	42
3.5.4. Abtötung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	44
3.5.5. Phagozytosemessung mittels Flow-Cytometrie	45
3.5.5.1. Phagozytose von <i>Sacc.cer.</i>	46

4.	UNTERSUCHUNGEN UND ERGEBNISSE	
4.1.	Chemilumineszenz	48
4.1.1.	Chemilumineszenz von isolierten Zellen	48
4.1.2.	Messungen in verdünntem Vollblut	52
4.1.3.	Ergebnisse der Vollblutmessungen	54
4.2.	Reduktion von Nitroblau-Tetrazolium	55
4.3.	Stimulierung des Glucose-1-14-C Stoffwechsels	56
4.4.	Abtötung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	58
4.5.	Vergleich der Ergebnisse	59
4.6.	Flow-Cytometrie	62
4.6.1.	Darstellungsmöglichkeiten von Subpopulationen phagozytierender Granulozyten	62
4.6.2.	Möglichkeiten der Messung von abgetöteten <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	67
4.6.3.	Phagozytostest mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	69
4.6.4.	Möglichkeiten der Messung von abgetöteten <i>Staphylococcus epidermidis</i>	71
5.	DISKUSSION	74
6.	ZUSAMMENFASSUNG	83
7.	SUMMARY	85
8.	LITERATURVERZEICHNIS	87

1. EINLEITUNG

Die Fähigkeit von Zellen, Fremdpartikel intrazellulär aufzunehmen wird als Phagozytose bezeichnet und gehört phylogenetisch zu dem ältesten immunologischen Abwehrsystem von Lebewesen. Im Organismus von höher entwickelten Lebewesen sind, neben einer Vielzahl von ortsständigen Zellen, dazu vor allem die neutrophilen Granulozyten des strömenden Blutes in der Lage.

Sie bilden damit einen ersten schnellreagierenden Schutzwall des Organismus gegen eingedrungene Mikroorganismen. Diese Funktion macht sie zu einem Hauptträger der unspezifischen Infektabwehr. Genetische Defekte im Phagozytosevermögen, wie sie beim Menschen bekannt sind, führen auf besonders dramatische Weise die Auswirkungen eines Zusammenbruchs dieses Abwehrprinzips vor Augen.

Mit zunehmendem Einsatz moderner immunologischer Techniken konnte zwar das Wissen um den komplexen Ablauf der Phagozytose enorm erweitert werden. Zugleich wird aber auch deutlich, daß ein einzelnes Meßsystem allein kaum diese Komplexität erfassen kann.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, vier verschiedene Methoden der Phagozytosemessung bei neutrophilen Granulozyten des Schweines zu vergleichen. Jeder der Tests erfaßt dabei andere Parameter. So wurden einerseits die Messungen von Stoffwechselaktivitäten, und andererseits die Abtötung von Hefezellen durch die Granulozyten einander gegenübergestellt.



2. LITERATURÜBERSICHT

2.1. Phylogenese des Immunsystems

Mit der Entstehung höher organisierter Lebewesen aus Einzellern, mußte zwangsläufig eine Spezialisierung von zellulären Aufgaben erfolgen. So können bereits bei Schwämmen, der niedersten Stufe mehrzelliger Lebewesen, Zellen nachgewiesen werden, die die ursprüngliche Beweglichkeit der amöboiden Einzeller beibehalten haben. Diese Mesenchymzellen erfüllen bereits die einfachste, aber für primitive Mehrzeller auch vorerst wichtigste Aufgabe einer unspezifischen Abwehrfunktion: Die Aufnahme von kleinen Fremdpartikeln (Phagozytose), und die gemeinsam organisierte Abkapselung von großen Partikeln (ROITT et al. 1985).

Nur in Anwesenheit eines verbesserten Abwehrsystems ist danach die weitere Höherentwicklung von Organismen möglich. Damit wird aber auch eine Arbeitsteilung der Immunozyten notwendig.

Bei Echinodermaten (Stachelhäuter) und Tunicaten (Manteltiere) wird bereits von lymphoiden Zellen gesprochen. Bei diesen Lebewesen ist auch der frühe evolutionäre Trend erkennbar, daß sich gleichgeartete Immunzellen als zelluläre Aggregate im Gewebe ansiedeln. Phylogenetisch spezialisiert sich damit nun eine spezifisch Antigen-abhängige Zelllinie heraus, während die Amöbozyten immer unspezifisch wirksam bleiben (HALL 1970).

Bei den Arthropoden kann dann bereits von einer funktionierenden humoralen Immunität gesprochen werden. Gleichzeitig wurde bei die-

sen Tieren auch nachgewiesen, daß diese löslichen Faktoren in der Lage sind, die Phagozytose der Amöbozyten zu verstärken.

Arthropoden besitzen also bereits funktionell unterschiedliche Zellinien, die sich in ihrer Wirkung aber ergänzen.

Die weiter stetig ansteigenden Erfordernisse einer differenzierenden Immunantwort erreichen ihren Höhepunkt dann bei den Wirbeltieren und hier speziell bei den Säugern.

Die grundlegende Organisation des Immunsystems ist aber bereits auf frühester evolutionärer Ebene angelegt (PLAYFAIR 1982).

Die Echinodermaten spielen in der Geschichte der modernen Immunologie eine große Rolle seit der Entdeckung der Phagozytose durch Metchnikoff 1882.

Er beobachtete in Seesternlarven die eintretenden Veränderungen, wenn diesen körperfremdes Material eingepflanzt wurde. Nach seinen Untersuchungen war am Ort der Einpflanzung schon in kürzester Zeit eine Anhäufung von Mesenchymzellen zu beobachten, die die eingepflanzten Partikel einhüllten und beseitigten. Diesen Zellen schrieb er die wichtigste Rolle im Ablauf der Entzündung und im Abbau von eingedrungenen Fremdpartikeln zu. In dieser Form hat der medizinische Lehrsatz auch über hundert Jahre später nichts von seiner Gültigkeit verloren.

2.2. Zellen des Immunsystems

Sämtliche immunkompetenten Zellen stammen von einer gemeinsamen hämopoetischen Stammzelle ab, deren Nachweis aber noch nicht gelungen ist. Aus dieser pluripotenten Zelle differenzieren sich zwei unterschiedliche Zelllinien :

Die lymphoide Reihe, aus der sich B- und T-Lymphozyten entwickeln, die Träger der zellulären und humoralen Immunität.

Die myeloische Reihe, aus ihr entspringen polymorphkernige Granulozyten, Monozyten, Thrombozyten und Mastzellen.

Die Granulozyten werden wie alle Zellen der myeloischen Reihe im Knochenmark gebildet, mit 2-3 Tagen Lebensdauer stellen sie jedoch eine relativ kurzlebige Zellpopulation dar. Die stetige Präsenz im Blut wird aber durch eine unerhört hohe Bildungsrate im Knochenmark aufrechterhalten, die beim gesunden Erwachsenen mit 8 Millionen Zellen pro Minute angegeben wird, und bei Infekten noch um ein Vielfaches gesteigert werden kann (ROITT 1985).

Polymorphkernige Granulozyten besitzen keine Antigenspezifität und werden als nicht teilbare "End-Zellen" mit einem hohen Glycogen-Vorrat zur Energiegewinnung in die Zirkulation entlassen (QUIE 1979). Nach der Anfärbbarkeit ihres Zytoplasmas können sie in neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten unterteilt werden.

Über 90% der zirkulierenden Granulozyten sind Neutrophile, bei den Gesamtleukozyten beim Schwein beträgt der Anteil ca. 25-40 % (Schulze et al. 1980). Ihre Aufgabe besteht darin, einen ersten,

schnellreagierenden Schutzwall gegen eingedrungene Mikroorganismen zu bilden, indem sie diese phagozytieren und abtöten.

Eosinophile Granulozyten sind in wesentlich geringerem Maße zur Phagozytose befähigt (GLEICH 1986). Ihre Hauptaufgabe ist es aber, große, nicht phagozytierbare Partikel extrazellulär abzutöten. So spielen sie eine besondere Rolle bei wandernden Parasitenlarven. Der signifikante Anstieg im Blut (Normwert ca. 0-6% der Blutleukozyten) kann durchaus diagnostisch genutzt werden.

Die Basophilen sind nur in Bereichen unter 0,5 % der Blutleukozyten anzutreffen. In zahlreichen Granula halten sie eine Reihe von pharmakologisch hochwirksamen Mediatoren gespeichert. Durch ihre hohe Affinität zu Ig E sind sie vor allem bei parasitären und allergischen Erkrankungen beteiligt.

Zahlreiche Erkrankungen bei Mensch und Tier können mit einer verminderten bis fehlenden Phagozytoseleistung in Zusammenhang gebracht werden (Zusammenstellung SMITH et al. 1982, KOKUBUN et al. 1979, GÜTLER et al. 1979).

Diese Defekte sind aus immunologischer Sicht besonders interessant, denn das Versagen bestimmter zellulärer Funktionen deckt natürlich in teilweise dramatischer Weise deren Aufgabe auf.

Klinisch sind sich die Fälle meist recht ähnlich. Den Granulozyten ist es dabei nicht möglich, die für einen gesunden Organismus im Prinzip harmlosen Bakterien zu eliminieren. Einmal in den Körper eingedrungene Keime siedeln sich zu pyämisch streuenden Herden an, die rezidivierenden Krankheitsverläufe finden hier ihre Erklärung.

Die genetische Determination für viele Phagozytosedefekte ist bekannt (NEUMANN et al. 1979, DeCHATELET et al. 1982). Unter diesem Gesichtspunkt gewinnt natürlich die Frage, inwieweit auch beim "gesunden" Individuum das Ausmaß der Phagozytosefähigkeit genetisch festgelegt ist, an Interesse.

Bei Selektionsexperimenten mit Mäusen konnten zwei Linien gezüchtet werden, die sich bezüglich hoher und niederer Phagozytoserate unterschieden (BUSCHMANN und MEYER 1981), und auch zwischen verschiedenen Schweinerassen zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Fähigkeit, Hefepartikel abzutöten (KLEINSCHMIDT 1983).

2.3. Phagozytose als ein mehrstufiges Geschehen

Die im Blutstrom zirkulierenden Granulozyten bezeichneten LEHRER et al.(1981) als ein ständig patrouillierendes Arsenal von Zellen mit der Aufgabe, Mikroorganismen und deren Folgeprodukte zu erkennen, und den Organismus davor zu schützen.

Die Voraussetzungen dafür sind Mobilität der Zellen und funktionierende Steuermechanismen zur Erkennung und Anlockung an den Ort des Geschehens.

Somit muß die Phagozytose grundsätzlich als eine Kaskade von eng vernetzten Einzelereignissen betrachtet werden (ROITT et al. 1985, ROITT 1984, GÜTLER et al. 1979, SMITH et al. 1982).

In vivo ist der Beginn der Phagozytose mit der Steuerung und dem komplexen Ablauf des entzündlichen Geschehens verflochten. Dabei kommt es durch die Verlangsamung der Fließgeschwindigkeit des Blutstromes zur Adhärenz der Granulozyten am Endothel der Kapillarwand, anschließend erfolgt der Durchtritt (Diapedese) und die Emigration der Zellen ins umgebende Gewebe.

Die dann folgenden Abläufe, vom Kontakt der Granulozyten mit den Mikroorganismen bis zu deren intrazellulärer Aufnahme und Abtötung, können in vitro untersucht werden, bedürfen aber gerade auch deshalb einer genaueren Betrachtung und funktionellen Unterteilung.

2.3.1. Opsonierung

Mit der Vielzahl der Erreger, mit denen sich ein Organismus ständig auseinandersetzen muß, hat sich auch ein auf serumlösliche Faktoren beruhendes Abwehrsystem entwickelt, das die zelluläre Erkennung und Beseitigung der Mikroorganismen durch Phagozytose unterstützt, bzw. überhaupt erst ermöglicht.

Unter dem Begriff der "Opsonierung" (opson=Würze) werden diese Serumbestandteile zusammengefaßt, die sowohl dem spezifischen wie unspezifischen Immunsystem zuzurechnen sind.

So ergaben Phagozytosestudien mit Rekonvaleszenzseren von Patienten mit schweren Pneumokokkenerkrankungen bei Verwendung von homologem (=das die ursprüngliche Krankheit auslösenden) Antigen signifikant höhere Werte im Vergleich zu normalem Serum. Dies läßt

sich mit dem erhöhten Antikörperspiegel gegen den Erreger nach überstandener Krankheit erklären. Die Wirkung von Komplement potenziert den Effekt von solch spezifischen Antikörpern noch zusätzlich (URBAN et al. 1982).

Von den meisten Autoren wird der Begriff der Opsonierung in erster Linie mit der Wirkung von Komplement (klassischer und alternativer Weg) und Antikörpern der Ig G Klasse erklärt (ROITT et al. 1985, SMITH et al. 1982). Trotzdem dürfte es sich mehr um ein funktionelles Prinzip als um eine genau eingrenzende Definition der beteiligten Faktoren handeln.

Untersuchungen von WILLIAMS et al. (1982) bestätigten auch die opsonierenden Eigenschaften von Ig M, und auch das sekretorische Ig A wirkt auf Schleimhäuten opsonierend (MACKIE et al. 1986, BHOGAL et al. 1987). Die Bedeutung der zu Beginn einer infektiösen Erkrankung ansteigenden "Akuten Phase Proteine" liegt in ihrer nachweislichen Phagozytoseunterstützung (PEPYS 1983). Der Organismus steigert somit in dieser kritischen Phase der Erkrankung zunächst einmal seine unspezifische Abwehr.

2.3.2. Chemotaxis

Die zielgerichtete Bewegung der Granulozyten vom Gefäßsystem aus, entlang eines chemischen Gradienten, zum Ort der eingedrungenen Mikroorganismen, wird als Chemotaxis bezeichnet und stellt einen der zentralen Abwehrmechanismen des Organismus dar (ISSEKUTZ et

al.1979). Dem Kliniker ist die Fähigkeit der Granulozyten zur Chemotaxis im Zusammenhang mit akuten großflächigen Entzündungen, wie Peritonitis oder Hautverbrennungen bekannt. In solchen Fällen kann die Auswanderung zu einem nahezu völligen Verschwinden der Granulozyten in der Blutbahn führen.

Die Substanzen, die solch steuernde Wirkungen entfalten, sind vielfachen Ursprungs, und unterscheiden sich ebenso im Grad ihrer Wirkung. Die am stärksten wirkenden Agentien sind die Leukotriene, insbesondere das Leukotriene B₄, ein Produkt des Arachidonsäureabbaus (FORD-HUTCHINSON et al. 1980). Aber auch andere Entzündungsmediatoren wie Prostaglandine und Thromboxane wirken chemotaktisch stimulierend (PALMBLAD 1981). Auch aktive Komplementfaktoren, wie C5a vermögen auf Granulozyten einen chemotaktischen Reiz auszuüben (ROITT et al. 1985).

2.3.3. Adhärenz

Die Ansprechbarkeit der Zelle gegenüber steuernden Einflüssen aus ihrer Umgebung, wird unter dem Prinzip der Interaktion zwischen Rezeptor und Ligand betrachtet (WRIGHT et al.1986).

Von den phagozytierenden Zellen müssen die Partikel zunächst einmal an die Zelloberfläche gebunden werden, bevor eine intrazelluläre Aufnahme erfolgen kann. Diese Anheftung geschieht durch eine Reihe von Rezeptoren, die ihr Gegenüber (=Ligand) durch einen strukturellen Synergismus erkennen. Dieser Vorgang ist im Gegen-

satz zur Aufnahme unabhängig von der metabolischen Energie der Zelle.

In der Vergangenheit wurden solche Bindungsstellen für zahlreiche Liganden beschrieben. Es zeigte sich aber, daß die Anheftung allein keinesfalls eine zwangsläufige Aufnahme in die Zelle zur Folge hat (HORWITZ et al. 1980). So konzentrierten sich genauere Untersuchungen auf die Bindungsmechanismen, bei denen auf die Rezeptoranheftung auch die Inkorporation folgte.

GRIFFIN et al. (1975) fanden dies vor allem bei zwei verschiedenen Rezeptoren, die Komplement und Ig-G binden können. EHLENBERGER und NUSSENZWEIG (1977) wiesen in ihren Untersuchungen auch deren unterschiedliche Funktionalität nach:

Erythrozyten, mit Komplement und Ig G beladen, wurden stärker phagozytiert als Erythrozyten, die nur Ig G an ihrer Oberfläche trugen. Bei ausschließlich mit Komplement opsonierten Erythrozyten kam es zu keiner Inkorporation.

Spätere Befunde bestätigten, daß die C3-Rezeptoren von größter physiologischer Bedeutung für die Verstärkung der durch Fc-Ig G vermittelten Phagozytose-Antwort sind (CZOP 1986). Sie steigern vor allem die Bindung an die Zelloberfläche, dem limitierenden Schritt in der Fc-vermittelten Phagozytose, und erhöhen damit die Effizienz des Fc-Rezeptors (MICHL, J., 1983).

Nach WRIGHT und SILVERSTEIN (1986) kommt es nach der Rezeptorbindung zur Freisetzung sogenannter "transmembraner Signale", die die weiteren Aktivitäten des Granulozyten regeln.

Während die Fc-Rezeptoren in allen Fällen ihrer Bindung eine gleichbleibende Antwort folgen lassen (UNKELESS et al. 1981), stellten GRIFFIN et al. (1979) fest, daß die Rezeptoren für die Komplement-Spaltprodukte C3b und C3i in unterschiedlichen Stadien vorliegen:

a : inaktiv; die Bindung mit dem Ligand ist möglich, aber es erfolgt kein Signal zur Phagozytose.

b : aktiv; auf die Bindung erfolgt durch freigesetzte transmembrane Signale die Ingestion.

Die von T-Zellen sezernierten Lymphokine können ruhende Rezeptoren aktivieren. Aktivierte Rezeptoren sind aber auf die ständige Anwesenheit von Lymphokinen, Fibronektin oder in vitro auf synthetische Phorbol-Ester angewiesen, ansonsten fallen sie schnell in den inaktiven Zustand zurück.

Bei von CROSS et al. (1985) durchgeführten in-vitro-Studien zeigte sich, daß bei Neutrophilen eine deutliche Veränderung festzustellen war, nachdem sie in Anwesenheit eines Lymphokine sezernierenden Zellstammes durch ein Filter (Boyden-Kammer) gewandert sind. Im Vergleich zu den zurückgebliebenen, war bei den durchgewanderten Granulozyten eine signifikant höhere Stoffwechselaktivität festzustellen. Damit ging auch eine gesteigerte Fähigkeit einher, Bakterien abzutöten. Ursache dafür ist neben einer Aktivierung von Rezeptoren auch eine erhöhte Aktivität der NADPH-Oxydase (vgl. 2.2.5.) .

Solcherart veränderte Zellen bezeichnen die Autoren als "primed". Sie messen dieser Aktivitätssteigerung auch eine wichtige physiologische Bedeutung am Ort des entzündlichen Geschehens bei.

BASS et al. (1986) bestätigten dies auch bei Granulozyten von infektiös erkrankten Patienten. Sie erkannten Subpopulationen von neutrophilen Granulozyten mit erhöhter Produktion von Wasserstoffperoxyd und einem gesteigerten Hexose-monophosphat-Shunt (vgl.2.2.5.).

2.3.4. Ingestion

Bei der Beschreibung der Rezeptoren wurde schon klar, daß deren Funktion über die reine Anheftung von Partikeln an Zellwandoberflächen hinaus auch die daran folgende Ingestion (=intrazelluläre Aufnahme) beeinflusst.

Phagozytierende Zellen sind in der Lage, durch Ausstülpungen ihrer Membran, sog. Pseudopodien, in amöboiden Bewegungen Partikel zu umschließen. Dieser Prozeß wurde von GRIFFIN et al. (1977) als "Reißverschluss-Mechanismus" bezeichnet. Sie meinen, daß bei dem Entlanggleiten der Plasmamembran an der Partikeloberfläche die gegenseitigen Anziehungskräfte von Rezeptor und Ligand nicht nur zur Adhärenz führen, sondern daß diese Kräfte dadurch erst die gezielte Ausbildung von Pseudopodien fördern. Finden sich nach anfänglichem Kontakt, keine den eigenen Membran-Oberflächenrezeptoren entsprechenden Liganden mehr, kommt es zum Stillstand der Bewegung. Der Prozeß der Ingestion bleibt auf der Stufe der Adhärenz.

renz stehen (Abb. 1a). Somit kommt neben der Art von Rezeptoren auch deren Verteilung auf der Partikeloberfläche eine übergeordnete Bedeutung zu. Eine Rundumverteilung führt zum Einschluß, während partielles Vorkommen von solchen Markern nur die Adhärenz erlaubt.

Ein Granulozyt ist zudem durchaus in der Lage, mehrere Partikel getrennt aufzunehmen, wenn diese sich an verschiedenen Stellen seiner Membran anlagern. Durch voneinander unabhängige Membranausstülpungen kommt es letztendlich auch zur Ausbildung von mehreren getrennt vorhandenen Phagosomen.

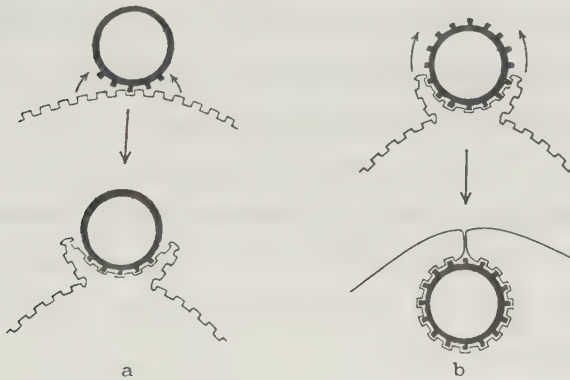


Abb. 1 : Der "Reißverschluss-Mechanismus" der Phagozytose

Die Verteilung von Liganden auf dem zu phagozytierenden Partikel ist von entscheidender Bedeutung :

- a: Stellenweises Vorkommen führt nur zur Adhärenz
- b: Eine Rundumverteilung ermöglicht den Einschluß

Betrachtet man Granulozyten als eigenständige zelluläre Organismen, die z.B. in der Lage sind, nach der gezielten Ausbildung von Pseudopodien die Ein- und Durchschleußung im Zytoplasma zu koordinieren, so stellt sich natürlich die Frage nach den regulativen Prinzipien.

WRIGHT und SILVERSTEIN (1986) schreiben dazu den Rezeptoren eine dominierende Rolle zu. Hat ein Rezeptor an einen Liganden gebunden, kommt es zur Freisetzung transmembraner Signale, die den weiteren Phagozytoseprozeß regeln.

Wie kompliziert man sich diesen regulativen Vorgang vorzustellen hat, veranschaulicht ein Beispiel:

Die Zelle als ein Kleinstlebewesen kann wie beschrieben gerichtete Bewegungen ihrer Plasmamembran ausführen. Sie besitzt entsprechend dem Actin und Myosin des Muskels dazu Ca-abhängige kontraktile Zytoskeetalproteine (CHAPONNIER 1987).

Um damit eine Bewegung zu ermöglichen, muß es der Zelle möglich sein, entsprechend dem Agonist und Antagonist der Skelettmuskulatur, diese Proteine gleichzeitig zu kontrahieren und zu entspannen. Diese Kontraktion ist energieabhängig, und wird von einer Mg-abhängigen ATP-ase aktiviert.

HOFFSTEIN (1979) beschreibt, daß mit der Aktivierung von Rezeptoren ein Anstieg des Calcium-Spiegels im Zytosol einhergeht. Dieses Calcium wird aus in der Membran liegenden Depots freigesetzt, die direkt von den aktivierten Rezeptoren beeinflusst werden.

Daß in Calcium- und Magnesium- freiem Medium keine Phagozytose möglich ist, beweist die Bedeutung dieser Elektrolyte.

2.3.5. Abtötung und Digestion

Die morphologische Differenzierung der Granulozyten von anderen weißen Blutzellen erfolgt sehr einfach durch deren reichlich granuliertes Zytoplasma. Diese Granula stellen zum Großteil zelluläre Speicherorganellen für den enzymatischen Abbau von Mikroorganismen dar, und können nach der Anfärbbarkeit ihres Inhaltes unterschieden werden.

Die primären oder azurophilen Granula (=Lysosome) enthalten saure Hydrolasen, Myeloperoxydase, Lysozym und die "kationischen Proteine" (Bedeutung siehe auch Abb. 2), während die sekundären oder spezifischen Granula zusätzlich zu Lysozym noch Lactoferin enthalten (BAGGIOLINI et al, 1978).

Den fast gleichzeitig mit der intrazellulären Aufnahme beginnenden bakteriziden Inaktivierungsmechanismen folgen zwei wichtige morphologische und metabolische Veränderungen des Granulozyten : Degranulation und dramatischer Anstieg des Sauerstoffverbrauchs (BABIOR 1978).

Intrazelluläre Degranulation beschreibt den Prozeß, bei dem die Lysosome mit den die phagozytierten Partikel enthaltenden Phagosomen zu Phagolysosomen fusionieren. Die eingeschlossenen Mikroorganismen werden damit einer Vielzahl von Enzymen ausgesetzt; KLEBANOFF (1975) bezeichnet dieses System als Sauerstoff-unabhängig.

Diese Definition muß neuerdings soweit relativiert werden, als zwar den PMN mit dem Inhalt ihrer Granula ein antimikrobielles

Arsenal von Enzymen ständig zur Verfügung steht und also nicht erst energieabhängig im Augenblick des Bedarfs gebildet werden muß. Auch entfalten diese Enzyme für sich allein bereits antimikrobielle Wirkung. Aber schon MILLER (1969) wies auf den synergistischen Effekt von Lysozym mit Wasserstoffperoxyd, einem Produkt aus dem oxydativen Glucoseabbau hin.

Die enge Vernetzung des enzymatischen Abwehrsystems mit den Reaktionsprodukten des Hexose-monophosphat-Shunts (HMS) wird im folgenden von immer mehr Autoren beschrieben.

SEGAL et al. (1981) wiesen auf die Rolle der oxydativen Metaboliten hin, die eine bedeutende Rolle in der Regulation des phagolysosomalen pH's spielen und zugleich die Aktivität des nicht oxydativen bakteriziden Systems steuern. Von BORREGAARD et al. (1984) wurde dann in den Phagolysosomen die Herkunft der H^+ Protonen aus dem HMS nachgewiesen.

So scheint sich immer mehr ein differenzierter Ablauf herauszukristallisieren, der der pH-Steuerung eine übergeordnete Rolle zukommen läßt (CRAVEN et al. 1986).

Wie hat man sich nun den Ablauf der Reaktionen vorzustellen ?

Das Enzym Superoxyd-Dismutase (SOD) katalysiert zu Beginn des "Respiratory burst" in hohem Maße die Umwandlung von $2 O_2^-$ zu O_2 und H_2O_2 (vgl. Abb. 2). Die dazu notwendigen 2 Protonen werden lokal den Phagolysosomen entzogen. Dies erklärt den zu Beginn der Phagozytose scheinbar paradoxen pH-Anstieg in den alkalischen Bereich. Genau dieses Milieu ist aber für die Wirkung der "kationischen

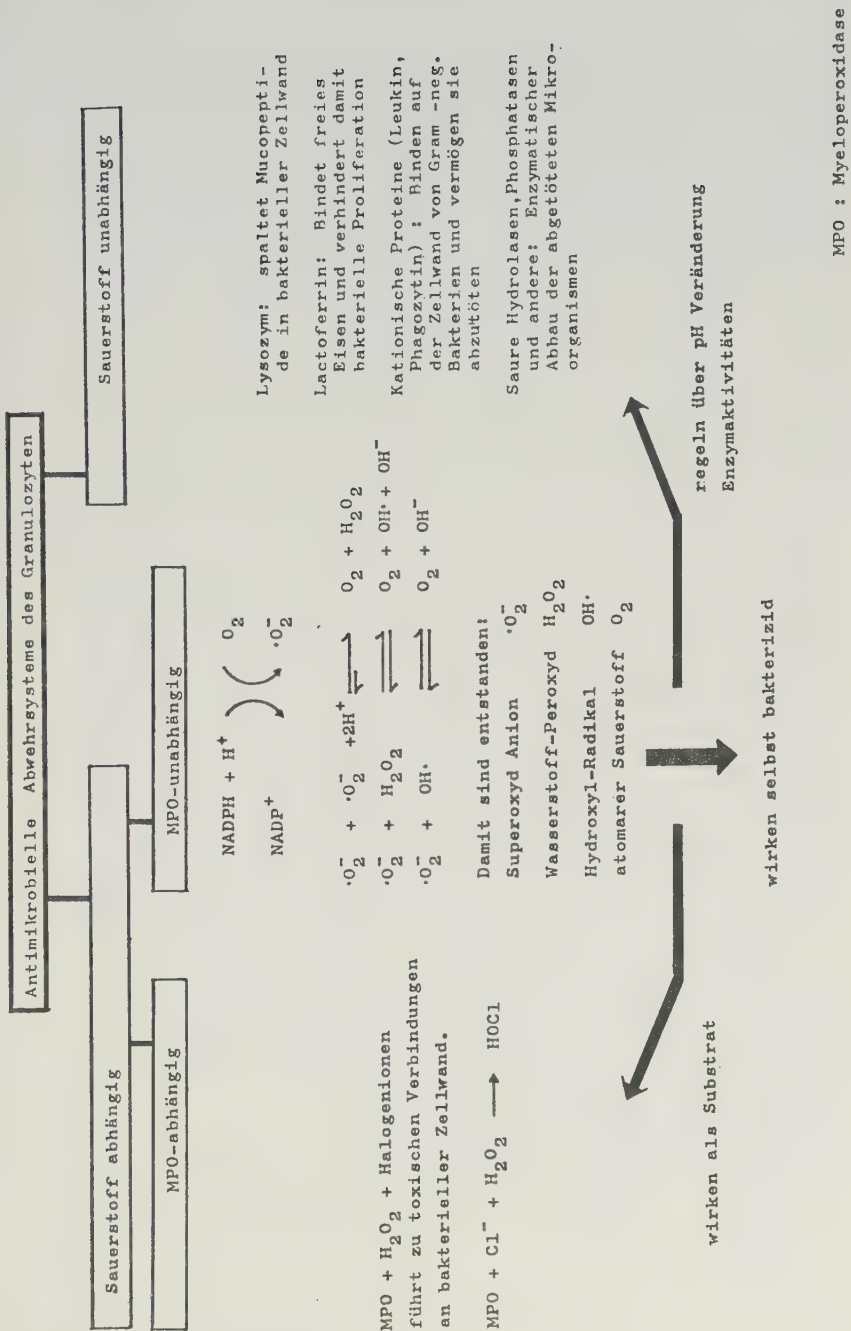


Abb. 2 : Antimikrobielle Abwehrsysteme von Granulozyten

Proteine" notwendig. Diese binden nur unter alkalischen Bedingungen an die äußere Lipidschicht von gramneg. Bakterien und vermögen diese abzutöten (ROITT et al. 1985). Nach 15 bis 30 min. sinkt der pH schrittweise so weit ab, daß bei neutralem pH das Optimum für die meisten bakteriziden Enzyme erreicht ist (SEGAL et al. 1981).

Erst pH 5 aktiviert dann die proteolytischen Enzyme der Digestion.

Die zweite große Veränderung des stimulierten Granulozyten, der starke Anstieg des Sauerstoffverbrauchs während der Phagozytose, wurde schon von BALDRIGE und GERARD (1933) beobachtet.

Während Cyanid bei normalen Säugerzellen durch die Blockierung der cytochromen Atmungsenzyme in den Mitochondrien damit auch die Sauerstoffaufnahme senkt, zeigten BECKER et al. (1958) daß Cyanid kaum hemmende Einflüsse auf den O_2 -Verbrauch von stimulierten Granulozyten hat. Der gesteigerte O_2 -Bedarf mußte somit andere Ursachen als die Bereitstellung von Energie haben, da die dazu notwendigen Atmungsenzyme mit Cyanid blockiert waren. Erst IYER et al. (1961) konnten zeigen, daß der Großteil des verbrauchten Sauerstoffs in H_2O_2 umgewandelt wird.

Während bei der Zellatmung Sauerstoff letztendlich zu Wasser reduziert wird, schlagen phagozytierende Zellen mit der Bildung von H_2O_2 einen völlig anderen Stoffwechselweg ein.

Den Granulozyten steht mit der Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen ein hochwirksames, bakteriell toxisches Abwehrsystem zur Verfügung.

Gleichzeitig mit Erhöhung der O_2 -Aufnahme geht ein deutlicher Anstieg der Glucose-Verwertung einher. Die Bildung von $^{14}CO_2$ aus Glucose-1- ^{14}C war dann der Nachweis dafür, daß von phagozytierenden Granulozyten hauptsächlich der Weg der direkten Glucoseoxydation (syn: Hexose-monophosphat-Shunt), also der Oxydation am C-1 des Glucosemoleküls beschritten wird (IYER et al. 1961).

Der erhöhte Glucoseabbau bei stimulierten Granulozyten, mit gleichzeitig eintretendem vermehrtem Sauerstoffverbrauch wird nun biochemisch in folgendem funktionellem Zusammenhang betrachtet (vgl. Abb. 3) :

Ausgangspunkt des Ansteigens des "Respiratory Burst" ist die Aktivierung einer NADPH-Oxydase (CROSS et al. 1985), die membrangebunden in der Zellwand bzw. in der Membran des Phagosoms liegt. Die Aktivierung erfolgt auf noch nicht vollkommen geklärte Weise entweder direkt von stimulierten Rezeptoren ausgehenden Signalen, oder über die Zwischenschaltung eines sekundären Signals. Die aktivierte NADPH-Oxydase katalysiert nun die Oxydation von $NADPH+H^+$ zu $NADP^+$, bei gleichzeitiger Reduktion von O_2 zu H_2O_2 . Als intermediäres Zwischenprodukt entsteht das instabile und hochreaktive Superoxyd-Anion (O_2^-), bei dem stattfindenden Elektronentransfer wird ein Photon freigesetzt (ALLEN et al. 1972). Die Anhäufung des oxydierten Coenzyms $NADP^+$ ist die Voraussetzung für die Aktivierung des Hexose-monophosphat-Shunts mit folgender Oxydation von Glucose, welche über zwei enzymatische Reaktionen katalysiert wird (BECK 1958):

In einem ersten Schritt werden von Glucose-6-P mittels der Glucose-6-P-Dehydrogenase (Enzym 1) zwei Wasserstoffatome auf NADP^+ übertragen, nach einer weiteren Dehydrierung (6-Phosphogluconat-Dehydrogenase = Enzym 2) und Abspaltung von CO_2 liegen nun die von der NADPH-Oxydase oxydierten Coenzyme wieder in reduzierter Form vor (Abb. 3).

Die Glucose wird zur Pentose oxydiert, mit gleichzeitiger Reduktion von 2O_2 zu $2 \text{H}_2\text{O}_2$; pro Molekül Glucose wird ein Molekül CO_2 freigesetzt. Die angefallene Pentose kann über Isomerasen in Fructose-6-P umgewandelt werden, und über die anaerobe Glykolyse zur Energiegewinnung herangezogen werden. Energieverbrauchende Prozesse wie Chemotaxis und Ingestion machen diesen Stoffwechselweg für den Granulozyten im entzündlichen Milieu mit hoher CO_2 -Spannung unabdingbar.

Das auf diesem Weg, der sog. Substratkettenphosphorylierung angefallene reduzierte $\text{NADH}^+ + \text{H}^+$ wird über die NADH-Oxydase wieder oxydiert, wobei nochmals O_2 zu H_2O_2 reduziert wird.

Das bei den oxydativen Vorgängen anfallende Superoxyd-Anion stellt ein hochreaktives instabiles Sauerstoffradikal dar, das selbst wieder sowohl oxydiert, als auch reduziert werden kann. Damit entstehen eine weitere Reihe von verschiedenen Sauerstoffspezies (Abb. 2), die alle stark antimikrobielle Eigenschaften entwickeln. Das Gleichgewicht der Reaktionen liegt eindeutig auf der Seite des H_2O_2 , da es den stabilsten Zustand einnimmt.

phagolysosomaler Raum

Zellmembran

Hexose-Monophosphat-Zyklus

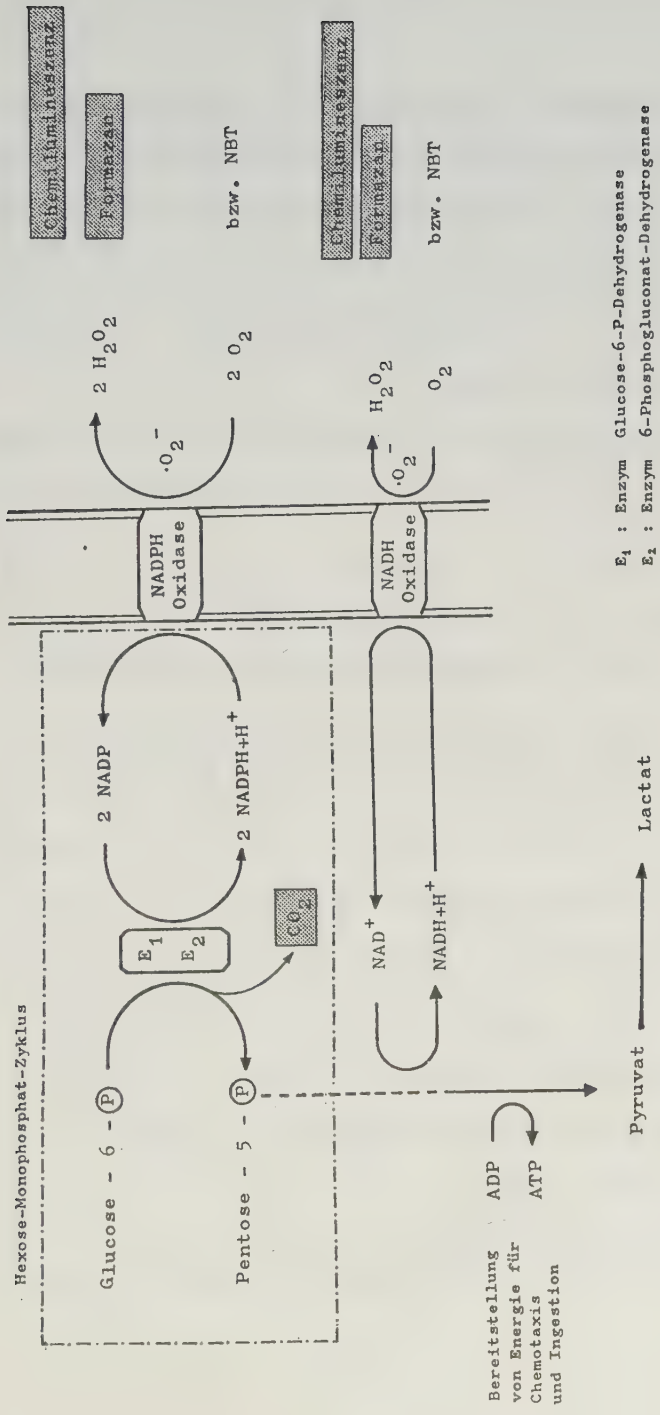


Abb. 3 : Stoffwechsel von phagozytierenden Granulozyten

Wasserstoffperoxyd in Verbindung mit dem Enzym Myeloperoxydase (MPO) stellt nach ROSEN et al. (1979) den effektivsten Mechanismus zur Abtötung von Mikroorganismen dar. Die Myeloperoxydase, in den lysosomalen Granula gespeichert, wird bei der Fusion in den Phagosomen freigesetzt. In Gegenwart von H_2O_2 kann es z.B. oxydativ Halogenionen wie J^- , Br^- oder Cl^- in bakterielle Wandstrukturen einbauen und damit lysieren.

Zusätzlich katalysiert es die Oxydation von Cl^- mit H_2O_2 zu hypochloriger Säure ($HOCl$), die selbst stark bakterizid wirkt (ZGLICZYNSKI 1985).

Die Stimulierungsfähigkeit während der Phagozytose steht in Zusammenhang mit der Menge des stimulierenden Agens.

BUSCHMANN et al. (1976) fanden einen direkten Einfluß des Verhältnisses der Granulozyten zur Zahl der zugefügten Bakterien auf den Glucoseverbrauch. Sie stellten fest, daß ab einer bestimmten Antigenkonzentration der Metabolismus exponentiell ansteigt.

LEHRER (1981) schreibt diesem Phänomen außerdem einen wichtigen Schutzmechanismus des Granulozyten zu: Die Fähigkeit, die Antwort von der Höhe des Reizes abhängig zu machen, d.h. erst ab einer gewissen Schwelle zu "detonieren", gibt ihm die Möglichkeit, das Auftreten eines "Fehlalarmes" auszuschließen. Das Abschwemmen des Granulozyten vom Ort der Stimulierung durch das zirkulierende Blut oder das Auftreten spontan entstehender transmembraner Signale bliebe damit folgenlos.

Im Laufe des andauernden Phagozytoseprozesses kommt es zu einer

langsamen Erschöpfung der nicht regenerierbaren Energievorräte der Zelle. Dem Granulozyten ist es in zunehmendem Maß erschwert, die stabile Zellwand zwischen dem Phagolysosom mit ihrem toxischem Inhalt gegenüber seinem Zytosol als Barriere aufrechtzuerhalten. Die Vakuole wird undicht und entleert ihren Inhalt letztendlich ins Zellinnere, was zur Zerstörung des Granulozyten führt. Mit diesem Untergang kommt es zur Freisetzung einer Vielzahl von chemotaktisch wirksamen Substanzen, die weiter Granulozyten anlocken (NIETHAMMER et al. 1975).

2.4. Möglichkeiten zur Messung der Phagozytosefähigkeit

Mit der Entdeckung des Phänomens der Phagozytose durch METCHNIKOFF war auch schon die erste einfache Möglichkeit der Messung entstanden (vgl. 2.1.) .

Auch spätere in vivo-Studien zur Messung der Phagozytoseaktivität beruhen alle auf diesem Prinzip der "Clearence" von intravenös injizierten Partikeln wie Tusche oder Bakterien.

Die Schwierigkeiten der Interpretation solcher Befunde liegen darin, daß neben den phagozytierenden Zellen des strömenden Blutes natürlich vor allem ortsständige Makrophagen von Lunge, Milz und Leber (Kupffer'sche Sternzellen) beteiligt sind.

Zusätzlich haben auch das Kreislaufgeschehen und die Zirkulationsgeschwindigkeit des Blutes großen Einfluß.

Bei in-vitro Methoden können dagegen Zellpopulation, Zahl der Zellen, dazu das Verhältnis der zu phagozytierenden Partikel, opsonierende Faktoren und andere Bedingungen genau definiert werden.

Dazu muß noch zwischen zwei prinzipiellen Möglichkeiten der Phagozytose-Messung unterschieden werden:

Direkte Methoden stellen die Zahl der pro Granulozyt aufgenommenen Partikel fest bzw. bestimmen den Prozentsatz der abgetöteten Bakterien, die zur Phagozytose angeboten wurden.

Bei den indirekten Methoden werden über Parameter wie Zunahme des O_2 -Verbrauchs, Glucose-Oxydation, oder die Freisetzung von Sauerstoff-Radikalen Rückschlüsse auf die bakterizide Kapazität der Zellen gezogen. Die Möglichkeit der Messung im Vollblut kommt dabei zellulären Funktionen unter natürlichen Bedingungen am nächsten, indem Einflüsse der Zellfraktionierung ausgeschaltet und interzelluläre Kommunikationen erhalten bleiben.

2.4.1. Chemilumineszenz

Die Aussendung von kaltem Licht, als einer Form von Lebensäußerung, war in der Biologie schon lange als ein Kuriosum bei einigen leuchtenden Insekten (Leuchtkäfer *Photinus pyralis*) und zahlreichen marinen Lebewesen (z.B. Bakterien wie *Vibrio fischeri* und der Meeresmuschel *Pholas dactylos*) bekannt und wurde als Biolumineszenz bezeichnet.

Wirkungsprinzip aller solchgearteter Erscheinungen ist das Freiwerden von Energie in Form von Lichtemission wenn Elektronen von einem höheren Energieniveau in einen niedrigeren Zustand zurückfallen.

ALLEN hat 1972 beschrieben, daß auch von phagozytierenden Zellen Lichtemissionen ausgehen. Diese Erscheinungen hängen auf das Engste mit der insgesamt stark exergonischen Reaktion bei der Reduktion von O_2 zu reaktiven Sauerstoffspezies zusammen, unter anaeroben Bedingungen ist keine Biolumineszenz zu beobachten. Die Ursachen werden in der Umlagerung von Elektronen auf sehr kurzlebige, in abnehmendem Maße energiereiche Zwischenstufen vermutet, wobei die jeweils freiwerdende Energie in Form von Photonen ausgestrahlt wird (Zusammenfassung FISCHER und STAUDINGER 1981).

Über den Wirkungsmechanismus herrscht im Detail jedoch noch Unklarheit. So ist nicht nur die direkte Sauerstoffreduktion, sondern auch das $MPO-H_2O_2-Cl^-$ System (siehe Abb. 2) an dieser Lichtemission beteiligt (ZGLICZYNSKI 1985).

FISCHER weist auch auf chemische Reaktionen wie die Synthese von Prostaglandin hin, die nicht direkt mit der Bildung von bakteriziden Substanzen befasst sind, aber trotzdem Photonen aussenden.

Die ausgesandten Lichtmengen sind insgesamt jedoch gering und damit als Parameter für quantitative Phagozytosemessungen nur unzureichend geeignet.

ALLEN und LOOSE (1976) fanden dann aber in Luminol (5-amino-2, 3-dihydro-1, 4-phthalazinedione) eine Substanz, die die Emission von Licht 100- bis 1000-fach verstärkt (=eigentliche Chemilumineszenz).

Die Oxydation von Luminol durch reaktive Sauerstoffspezies führt zur Bildung von α -Aminophthalation mit angeregten Elektronen, dabei freiwerdende Energie wird als Licht bei 425 nm ausgesendet.

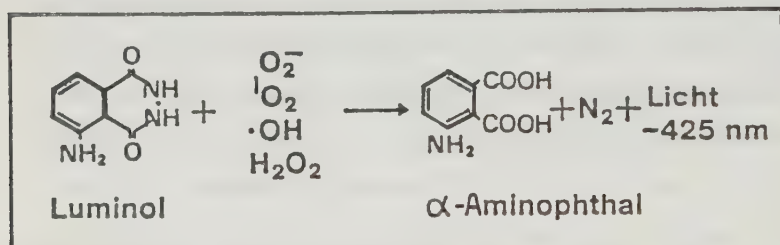


Abb. 4 : Oxydation von Luminol

Das Schema zeigt, daß die Luminol-abhängige Chemilumineszenz das Resultat einer komplizierten Serie von Reaktionen mit allen von Granulozyten produzierten Sauerstoffspezies darstellt. Der exakte Reaktionsweg ist trotzdem unbekannt, ist aber erstaunlicherweise Myeloperoxydase-abhängig. Dies ist insofern bemerkenswert, als bei MPO-defizitären Granulozyten keine Luminol-abhängige Chemilumineszenz gemessen werden konnte, obwohl die Zellen von solchen Patienten sogar durch eine erhöhte Bildung von Sauerstoffradikalen diesen Mangel zu kompensieren suchten (De CHATELET 1982).

Da eine lineare Beziehung zwischen Chemilumineszenz-Antwort und Zahl der Granulozyten besteht (ANGLE et al. 1983), ist diese Methode auch für Messungen im Vollblut geeignet. Über die Bestimmung des Differentialblutbildes können die gemessenen Werte

auf eine standardisierte Zellzahl bereinigt, und so untereinander verglichen werden (KATO et al. 1981).

2.4.2. Reduktion von Nitroblau-Tetrazolium Salz (NBT)

Tetrazolium-Salze werden in ihrem löslichen gelben Zustand von lebenden Zellen durch deren aktive mitochondriale Tätigkeit zu schwerlöslichem blau-schwarzem Formazan reduziert (SLATER et al. 1963). Neuerdings gewinnt diese Methode wieder zunehmende Bedeutung zur Messung von Zellaktivitäten (MOSMAN 1983, GERLIER 1986). Grundsätzlich davon unterscheidet sich jedoch der Einsatz von Nitroblau-Tetrazolium-Salz (NBT) bei der Phagozytosemessung wegen der besonderen Stoffwechselwege der Granulozyten.

Da NBT hauptsächlich während des Phagozytose induzierten "Respiratory burst" reduziert wird, schloß DE CHATELET (1974), daß dies auch von der NADPH-Oxydase katalysiert wird (vgl. Abb.3). Andere Autoren machen inzwischen das instabile Superoxyd-Anion mitverantwortlich. Die genauen biochemischen Zusammenhänge sind im Einzelnen noch nicht völlig geklärt.

Ohne Zweifel ist die NBT-Reduktion von stimulierten Granulozyten eine Konsequenz des oxydativen Metabolismus dieser Zellen, da Sauerstoff dafür notwendig ist (BAEHNER 1976). Das blaue Formazan kann im Mikroskop innerhalb der granulozytären Phagosomen gefunden werden, wenn diesen als Stimulus phagozytierbare Partikel gegeben werden. Da bei einem Fehlen des "Respiratory burst" keinerlei NBT-

Reduktion erfolgt, war die Anwendung dieses Tests lange Zeit auf diesen Granulozytendefekt beschränkt (NEUMANN 1979). Bringt man dagegen nach Lysis der Zellen das Formazan in Lösung, so kann durch eine photometrische Bestimmung eine quantitative Auswertung erfolgen (ROTH 1981). Da die mikrobielle Kapazität der Zellen eng mit der Höhe des "Respiratory burst" verknüpft ist, steht auch das Ausmaß der NBT-Reduktion damit in Zusammenhang (FRYMUS et al. 1985).

2.4.3. Stimulierung des Glucose-1- ^{14}C Stoffwechsels

Der während der Phagozytose zu beobachtende dramatische Anstieg des Sauerstoff- und Glucoseverbrauchs dient fast einzig der Bildung von bakteriziden Sauerstoffradikalen und steht nicht der Energiegewinnung zur Verfügung. Die dazu notwendige Reduktion von Sauerstoff wird in erster Linie durch die direkte Oxydation von Glucose am C1 des Moleküls, über den Hexose-Monophosphat-Zyklus ermöglicht (vgl. Abb3).

Dieser Stoffwechselvorgang kann über die Freisetzung von $^{14}\text{CO}_2$ aus Glucose-1- ^{14}C isopenanalytisch bestimmt werden, was auch im Vollblut möglich ist (KEUSCH 1972, BUSCHMANN 1973). Die Höhe des Anstiegs des HMS im Vergleich zum Ruhestoffwechsel steht in direktem Verhältniss zur bakteriziden Fähigkeit der Granulozyten (BUSCHMANN 1976).

2.4.4. Abtötung von Hefezellen

LEHRER und CLINE beschrieben 1969 eine Methode zur direkten Messung der bakteriziden Fähigkeit von Granulozyten. Sie machten sich dabei das Prinzip zunutze, daß tote gegenüber vitalen Zellen von *Candida albicans* mit Methylenblau differenzierend angefärbt werden können. Setzt man die phagozytierten Hefen durch Lysis der Granulozyten wieder frei, dann kann der anfärbbare abgetötete Anteil im Mikroskop ausgezählt werden.

NEUMANN und KONORZA (1979) verwendeten statt *Candida albicans* die apathogene und im Laborgebrauch einfach zu handhabende Bäckerhefe. Bei vergleichenden Untersuchungen zwischen *Saccharomyces cerevisiae* und *Cand. albicans* konnten sie keinen antigenen Unterschied auf Granulozyten feststellen.

2.4.5. Messung der Phagozytose mit Hilfe der Flow-Cytometrie

Bei der Flow-Cytometrie werden in einem Flüssigkeitsstrahl Zellen an einer Lichtschranke vorbeigeschickt, die von einem Laserstrahl und einer Photodiode gebildet wird. In diesem Laserstrahl wird jede einzelne Zelle nicht nur nach Größe und optischer Dichte vermessen, sondern es besteht zusätzlich die Möglichkeit, sie mit grüner bzw. roter Fluoreszenz zu markieren. Diese Technik bietet damit Lösungsmöglichkeiten für eine breite Palette von immunologischen Fragestellungen an.

Auch für die Messung der Phagozytose kommt diese Methode mit ihrer unerhörten Variationsmöglichkeit zunehmend zum Einsatz (STEINKAMP 1981, ARNAOUT 1981, WILSON 1985, SVEUM 1986). Alle diese Autoren machen sich dabei die Möglichkeit zunutze, Zellen anhand ihrer Fluoreszenz zu unterscheiden.

Bietet man den Granulozyten fluoreszierend markierte Partikel zur Phagozytose an, so werden sich Zellen, die ein, zwei oder drei solcher Partikel aufgenommen haben, prinzipiell durch ihre zwei- bzw. dreifache Fluoreszenzintensität unterscheiden. Auf eine Achse aufgetragen sind solche Subpopulationen als mehr oder weniger deutlich abgesetzte Peaks zu erkennen.

Während alle vorher hier beschriebenen Testprinzipien die Aktivitäten der einzelnen Granulozyten zu einem Gesamtergebnis addieren, ermöglicht es die Technik der Flow-Cytometrie, Einblicke auf die Aktivität der Einzelzelle zu bekommen.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Verzeichnis der verwendeten Materialien

Acridin-Orange : Serva, Heidelberg

Bovine Pankreas-DNAse : Serva, Heidelberg

Dextran-T-70 : Pharmacia, Uppsala Schweden

EDTA : Serva, Heidelberg

Ficoll-Trennlösung: Biochrom, Berlin

Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) : Serva, Heidelberg

Glucose-1-14-C : Amersham, Braunschweig.

50 μCi Glucose-1-14C in 560 ml HBSS verdünnt.

Endaktivität ist 0,0893 μCi / ml.

Hanks'-Puffer-Lsg (HBSS): 8g NaCl, 4g KCl, 48mg Na_2HPO_4 ,

60mg KH_2PO_4 , 0,2g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, 0,14g CaCl_2 ,

1g Glucose, 0,35g NaHCO_3 , ad 1000 ml Aqua dest.

Heparin-Natrium-Salz : Karl Roth KG Karlsruhe

Latex-Partikel, 1,0 μm FITC markiert: Polysciences, Inc. Warrington

Luminol : LKB, Gräfelfing

1,77 mg Luminol in 1 ml DMSO lösen ($=10^{-2}\text{M}$) und

bei 4°C aufbewahren, vor Gebrauch 50 μl in 4,95 ml PBS

lösen ($=10^{-4}\text{M}$).

Lysing-Reagenz : 8,26 g NH_4Cl , 1,09 g NaHCO_3 ,

0,037 g Na-EDTA, ad 1000 ml Aqua dest.

Nitroblau-Tetrazolium-Lösung (NBT) :

2 mg/ml NBT (Grade III, Sigma Chemie Deisenhofen)

in HBSS einwiegen, und 1 h bei Raumtemperatur

lösen. Nach Filtrieren (Sartorius-Membranfilter
0,45 μm) bei 4°C aufbewahren.

Na-desoxycholat : Serva, Heidelberg

N-Ethylmaleimid : Sigma Deisenhofen

N-N-Dimethylformamid : Merck Darmstadt

PBS, phosphatgepufferte Kochsalzlösung:

8 g NaCl, 0,2g KCl , 1,15 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$,
0,2 g KH_2PO_4 , 0,1 g CaCl_2 , 0,1 g $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$
ad 1000 ml Aqua dest.

PBS ohne Ca/Mg : 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,2 g KH_2PO_4 , 2,14 g
 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ ad 1000 ml Aqua dest.

Phorbol-Myristat-Acetat (PMA) : Sigma Deisenhofen

2 mg PMA in 1 ml DMSO lösen und bei 4°C aufbewahren.

Vor Gebrauch 25 μl in 5 ml PBS lösen.

Propidium-Jodid : Sigma Deisenhofen

3.2. Isolierung von Zellen

3.2.1. Gewinnung von Schweineleukozyten

Heparinisiertes Blut (25 IU/ml) von klinisch unauffälligen, frischgeschlachteten Schweinen wurde 2 : 1 mit 6%iger Dextran-T-70-Lösung vermischt und in einer aufrecht stehenden Kunststoffspritze bei 37 °C inkubiert. Nach 1 Stunde sind die Erythrozyten fast vollkommen sedimentiert, das leukozytenreiche Plasma konnte dann mit einer weitlumigen, gebogenen Blutentnahmekanüle aus der aufrecht gehaltenen Kunststoffspritze in ein steriles 50 ml Plastikzentrifugenröhrchen überführt werden.

Nach einmaligem Waschen (10 min bei 400 x g) mit PBS ohne Ca^{++} und Mg^{++} wurden die verbliebenen Erythrozyten des Leukozytenpellets durch 5 minütiges Einwirken von 10 ml kaltem Lysing-Reagenz lysiert und anschließend nochmals mit PBS ohne Ca^{++} und Mg^{++} gewaschen (10 min bei 400 x g).

Der Überstand wurde abgegossen und das Leukozytenpellet in PBS- oder Hanks-Pufferlösung aufgenommen.

Die Zellzahl konnte mit einem Hämozytometer (HC 222 Clinicon, Mannheim) bestimmt werden .

Der Anteil lebender Zellen wurde entweder durch Zählung mit Trypanblau (0,16% in physiol.Kochsalzlösung) in der Zählkammer, oder gleichzeitig bei der Bestimmung des Differentialblutbildes mittels Cytofluorometrie (s.3.4.) ermittelt.

Die Zellzahl wurde auf 7×10^6 Granulozyten / ml eingestellt.

3.2.2. Isolierung von Granulozyten

Das von der Dextransedimentierung gewonnene Leukozytenreiche Plasma (siehe: 3.2.1.) wurde vorsichtig auf die gleiche Menge Ficoll-Trennlösung in Glaszentrifugenröhrchen geschichtet.

Die Proben wurden 30 min bei 400 x g zentrifugiert. Nach Abnehmen des Überstandes und der Interphase wurde das Pellet in kaltem Lysing-Reagenz resuspendiert, um die verbliebenen Erythrozyten zu lysieren. Nach 5 min wurde zweimal mit Ca^{++} -und Mg^{++} -freiem PBS-Puffer gewaschen, das letzte Sediment nach Abgießen des Überstandes in Hanks-Puffer aufgenommen und auf $2-7 \times 10^6$ Zellen / ml eingestellt.

Eine Reinheit von mindestens 95% Granulozyten war die Regel.

3.2.3. Isolierung von Lymphozyten

Das bei der Dextransedimentierung gewonnene Leukozytenreiche Plasma (siehe: 3.2.1.) wurde vorsichtig auf die gleiche Menge Ficoll-Trennlösung in Glaszentrifugenröhrchen geschichtet.

Die Proben wurden 30 min bei 400 x g zentrifugiert. Nach vorsichtigem Abnehmen des Überstandes wurde die Interphase mit der Pipette entnommen und zweimal mit PBS ohne Ca^{++} und Mg^{++} gewaschen (10 min bei 600 x g) . Noch vorhandene Erythrozyten wurden zwischen den Waschgängen durch 5 minütiges Einwirken mit kaltem Lysing-Reagenz lysiert.

Nach Bestimmung der Zellzahl wurde die Konzentration auf $1-2 \times 10^6$ Zellen / ml eingestellt.

3.2.4. Isolierung von Thrombozyten

40 ml heparinisiertes Blut (25 IU / ml) von klinisch unauffälligen, frischgeschlachteten Schweinen wurde unverdünnt in sterile 50 ml Plastikzentrifugenröhrchen gegeben und 10 min bei $200 \times g$ und 4°C zentrifugiert.

Der Überstand (= thrombozytenreiches Plasma) wurde gewonnen und dann 15 min mit $1400 \times g$ bei 4°C zentrifugiert.

Erneut wurde der Überstand (= thrombozytenfreies Plasma) gewonnen, das Sediment in PBS ohne Ca^{++} und Mg^{++} gründlich resuspendiert und nochmals 10 min. bei $1400 \times g$ bei 4°C gewaschen. Das Thrombozytensediment wurde in PBS-Puffer aufgenommen und auf 5×10^7 Thrombozyten / ml eingestellt.

Die Zählung in der Zählkammer erfolgte entweder im Lichtmikroskop oder nach Anfärbung der Thrombozyten 1:10 mit Acridin-Orange ($0,1\text{mg}/100\text{ml}$ PBS) im Fluoreszenzmikroskop.

3.3. Präparation der Phagozytose-Stimulantien

3.3.1. Mikroorganismen

3.3.1.1. Staphylococcus epidermidis

Ein bis zwei Kolonien des auf Blutagarplatten gezüchteten Staph. epid. wurden in 1 ml PBS gelöst, mit einem sterilen Spatel auf einer Blutagarplatte ausgestrichen, und 24 Stunden bei 37°C inkubiert.

Die dicht gewachsenen Mikroorganismen konnten mit 5-10 ml phys. NaCl-Lsg. von der Platte abgeschwemmt werden, wurden danach 10 min bei 1200 x g zweimal gewaschen, in NaCl-Lsg. resuspendiert, im Photometer (Beckman Spektrophotometer 35) bei 400 nm gegen NaCl-Lsg. auf 2×10^9 / ml eingestellt, und anschließend im Wasserbad 45 min. bei 70°C abgetötet.

3.3.1.2. Fluoreszenzmarkierung von Staphylococcus epidermidis

Die über 24 h dicht gewachsenen Mikroorganismen (s.3.3.1.) wurden mit 10 ml PBS von der Platte abgeschwemmt und je 10 min bei 1200 x g zweimal in PBS gewaschen. Nach dem letzten Waschgang wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 5ml HBSS mit 0,01% Gelatine gründlich resuspendiert, und in einen 50 ml Erlenmeyerkolben überführt.

Vor der Zugabe von 5 ml FITC-PBS (2 mg/ml) wurden noch bestehende Verklumpungen der Mikroorganismen durch 5 minütige Behandlung im Ultraschallbad gelöst.

Die Suspension wurde nun auf dem Magnetrührer 1 Std. bei Raumtemperatur und weitere 3 Std. bei 4°C inkubiert, dann in ein 50 ml Glaszentrifugenröhrchen überführt.

Anschließend wurde so oft mit HBSS 0,01% Gelatine gewaschen (4°C 10 min bei 1200 x g), bis der steril filtrierte (Sartoriusfilter 0,2µm) Überstand keinen meßbaren Farbstoff mehr enthielt (Bestimmung bei 495 nm im Spektrophotometer 35, Beckman).

Das Pellet wurde in HBSS mit 0,01% Gelatine aufgenommen, Verklumpungen im Ultraschallbad gelöst und durch Auszählen in der Zählkammer im Fluoreszenzmikroskop auf 1×10^7 Bakterien / ml eingestellt, anschließend in 2 ml Fläschchen portioniert und bei -20°C eingefroren.

3.3.1.3. Fluoreszenzmarkierung von *Saccharomyces cerevisiae*

Eine Spatelspitze frischer Bäckerhefe wurde mit 10 ml PBS in einem 50 ml Erlenmeyerkolben gelöst. Nach Zugabe von 10 ml FITC-PBS (2 mg/ml) wurde die Lösung 1 Std. bei Raumtemperatur auf dem Magnetrührer inkubiert. Nach weiteren 3 Stunden Einwirkungszeit bei 4°C wurden die Hefezellen so oft in PBS gewaschen (Kühlzentrifuge 4°C, 10 min bei 500 x g), bis der Überstand keinen Farbstoff mehr enthielt (s.3.3.1.2.).

Das letzte Pellet wurde in PBS aufgenommen und im Fluoreszenzmi-

kroskop die Zellzahl bestimmt. Gleichzeitig erfolgte auch eine Überprüfung der Gleichmäßigkeit der Fluoreszenzintensität. Auf $5 \times 10^6/\text{ml}$ eingestellt wurden die Hefen in 1 ml Portionen abgefüllt und bei -20°C eingefroren. Die so behandelten Proben waren, wie Vorversuche ergaben, ohne Vitalitätsverlust ca. 2 Wochen lagerbar.

3.3.2. Präparation und Opsonierung von Zymosan

In einen sterilen 200 ml Erlenmeyer-Kolben wurden 400 mg Zymosan eingewogen, in 40 ml kaltem HBSS-Puffer mit Ca^{++} und Mg^{++} gelöst, und 5 min im Ultraschallbad homogenisiert. Nach Zugabe von 40 ml gepooltem Schweineserum wurde eine Stunde auf dem Magnetrührer bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach Übernahme der Lösung in ein Glaszentrifugenröhrchen wurde 10 min bei $250 \times g$ zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde zweimal mit 40 ml 0,01 M EDTA 10 min bei $250 \times g$ gewaschen, mit einer 15 minütigen Einwirkungszeit zwischen den Waschgängen.

Nach dem letzten Zentrifugieren wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 40 ml HBSS-Puffer resuspendiert, 5 min im Ultraschallbad homogenisiert, in je 1 ml Serumfläschchen portioniert, und bei -20°C eingefroren.

3.4. Bestimmung des Differentialblutbildes und der Vitalität der Zellen mittels Flow-Cytometrie

Im Cytofluorographen (Spektrum III, Orho-Diagnostics, Dr. Molter, Neckargmünd) können Zellen anhand ihrer unterschiedlichen Größe und optischen Dichte im Laserstrahl unterschieden werden.

Da der Farbstoff Propidium-Jodid nur die DNS von toten Zellen rot-fluoreszierend anfärbt, ist somit eine gleichzeitige Vitalitätsüberprüfung möglich.

Nach Einstellen eines veränderbaren Ausschnittes ("Trigger-Region") im Granulozytenfeld können somit gemessen werden:

- * Prozent von Granulozyten an den Gesamtleukozyten
- * Prozent der rot-fluoreszierenden (=toten) Zellen innerhalb der Granulozytenpopulation.

In 15 x 100 mm Glasröhrchen wurden zu 100 µl heparinisiertem Vollblut (25 IU/ml) 1ml Lysing-Reagenz gegeben (bei der Bestimmung von isolierten Leukozyten 100 µl Zellsuspension und 1ml PBS o. Ca^{++} und Mg^{++}). Fünf Minuten nach der Zugabe von 30 µl Propidium Jodid (0,05 mg/ml) wurden 2 ml PBS o. Ca^{++} u. Mg^{++} zugegeben. Nach Messung am Ortho-Spektrum III kann die Zahl der vorhandenen vitalen Granulozyten bestimmt werden.

3.5. Methoden der Phagozytose-Messung

3.5.1. Chemilumineszenz-Test

Bakterizid wirkende Sauerstoffradikale, die von Granulozyten zur Abtötung der phagozytierten Erreger abgegeben werden, können nach der Kopplung mit sog. luminogenen Substanzen, wie z.B. LUMINOL^R direkt durch die dadurch freiwerdende Lichtemission gemessen werden.

Versuchsablauf:

Im Doppelansatz wurde in durchsichtigen 12 x 45 mm

Kunststoffküvetten (Berthold, Wildbad) jeweils vorgelegt :

	Probe	Kontrolle
LUMINOL ^R 10 ⁻⁴ M	200 µl	200 µl
PBS	500 µl	700 µl
Vollblut (25 IU Heparin/ml) (bzw. isol. Zellen)	100 µl	100 µl

Nach kurzem Mischen auf dem Rüttler wurden die Küvetten in den 37 °C warmen Zählkammern des BIOLUMAT^R LB 9505 (Berthold, Wildbad) 15 min vorinkubiert.

In die Probe wurden dann 200 µl Phorbol-Myristat-Acetat (0,01mg/ml in PBS) gegeben und vorsichtig gemischt. Nach Zurückstellen der Küvette in die Meßkammer wurde das Gerät gestartet.

Die Aufzeichnung der Lichtemissionen (cpm) erfolgte über die Zeit von 20 min mit dem APPLE^R Anwenderprogramm. Drei Proben konnten gleichzeitig mit drei Kontrollen gemessen werden.

Die Datenauswertung der Chemilumineszenzkurven:

Gegenüber Einzelmeßdaten, wie dem Kurvenmaximum, haben Integralwerte (=Fläche der Kurve) einen geringeren statistischen Fehler. Die erhaltenen Chemilumineszenzwerte (Integr. cpm x $10^3/20$ min) wurden über die Ermittlung der vorliegenden Granulozytenzahl auf die Zahl von 7×10^6 Granulozyten hochgerechnet. Damit wurde eine vergleichbare Basis mit dem NBT-Test geschaffen.

Nach Abzug der Kontrollwerte von den Versuchswerten liegen die Ergebnisse vor als:

$$\text{Integ. cpm} \times 10^3 / 7 \times 10^6 \text{ PMN} / 20 \text{ min.}$$

3.5.2. Reduktion von Nitroblau-Tetrazolium (NBT)

Phagozytose als ein komplexer Vorgang von lebenden Zellen kann auch über den gesteigerten oxydativen Stoffwechsel gemessen werden, während dem das Tetrazolium Salz NBT in tiefblaues Formazan reduziert wird.

Für jede zu untersuchende Probe wurden Dreifachansätze in sterilen silikonisierten 15 x 100 mm Glasröhrchen angesetzt.

Ansätze	Probe	Kontrolle
0,2 ml NBT-Lsg.	+	+
0,1 ml opsoniertes Zymosan	+	-
0,1 ml HBSS	-	+

Die vorliegenden Ansätze wurden gut gemischt im Wasserbad bei 37°C 15 min unter periodischem Schütteln inkubiert. Danach wurde je 1ml der Granulozyten ($7 \times 10^6 / \text{ml}$) zugegeben und weiter 5 min. unter periodischem Schütteln im Wasserbad inkubiert. Nach exakt 5 Minuten wurde die Reaktion mit 5 ml kalter 1 mM Ethylmaleimid-Lsg. gestoppt.

Nach dem Zentrifugieren (10 min bei 500 x g) wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 5 ml N-N-Dimethyl-formamid resuspendiert und durch 10 min Behandlung im Ultraschallbad vollkommen gelöst.

Das schwerlösliche Formazan wurde nun durch weiteres 15minütiges Erhitzen der Glasröhrchen im kochenden Wasserbad in Lösung gebracht und anschließend noch vorhandene Zellfragmente durch Zentrifugieren (10 min bei 1600 x g) aus dem Überstand entnommen.

Die optische Dichte (OD) des geklärten Überstandes wurde nun in Quarkzuvetten gegen N-N-Dimethylformamid als Leerwert im Spektralphotometer (Beckman) bei 515 nm bestimmt.

Die Mittelwerte der Kontrollen wurden von denen der Proben abgezogen.

Die erhaltenen Werte sind definiert als:

$\text{OD} / 7 \times 10^6 \text{ PMN} / 5 \text{ min in } 5\text{ml N-N-Dimethylformamid.}$

3.5.3. Stimulierung des Glucose-1-14C-Stoffwechsels

Der mit Beginn der Phagozytose einsetzende "Respiratory burst" kann über den Anstieg der Glucoseoxydation der Granulozyten gemessen werden. Dabei wird von radioaktiv markierter Glucose-1-14C auf

dem Wege der direkten Oxydation an C-1, markiertes $^{14}\text{CO}_2$ abgespalten. Nach Lysis der Zellen zur CO_2 -Freisetzung wird dies an Hyaminhydroxid gebunden und nach dessen Lösung in Szintillationsflüssigkeit die Radioaktivität bestimmt.

Als Versuchsgefäße dienten spezielle 25 ml Erlenmeyerkolben, in deren Bodenmitte ein Glasring aufgeschmolzen ist, in den der herausnehmbare 1 ml Glaszylinder zur Aufnahme des Hyaminhydroxids gestellt werden kann. So ist gewährleistet, daß der "Zylinder" mit der radioaktiven Versuchslösung nicht in Kontakt kommen kann.

Proben und Kontrollen wurden fünffach in silikonisierten sterilen Kolben angesetzt.

Versuchsablauf:

In jedes Kölbchen wurden 0,2 ml heparinisiertes Vollblut (25 IU/ml) und 1 ml HBSS mit ^{14}C -Glucose ($0,0893 \mu\text{Ci} / \text{ml}$) gegeben. Die Phagozytose der Proben wurde mit 0,1 ml einer Staph.epid.- Suspension (s.3.3.1.) stimuliert, während bei den Kontrollen das Volumen mit 0,1 ml phys.NaCl-Lsg.ergänzt wurde.

Mit einem Gummistopfen wurden die Kolben dicht verschlossen und 30 min bei 37°C auf einer Schüttelmaschine (40 rpm) inkubiert.

Danach wurden durch den Gummistopfen 1 ml 2 N HCl zur Lysis der Zellen und 0,4 ml Hyaminhydroxid (Koch-Light Lab., Colnbrook Bucks,England) in den Glaszylinder injiziert.

Nach einer weiteren Inkubationszeit von 30 min bei 37°C auf der Schüttelmaschine wurden die Glaszylinder mit dem Hyaminhydroxid entnommen, in ein Szintillationsfläschchen gegeben und dieses mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit (Ready-Solv NA, Beckman, München) aufgefüllt.

Die Radioaktivität wurde im β -Zähler (Isocap 300, Nuclear-Chicago, USA) gemessen. Nach Berechnung des Mittelwertes wurde ein Index (P/K) von stimulierter Probe (P) zu unstimulierter Kontrolle (K) gebildet.

3.5.4. Abtötung von *Saccharomyces cerevisiae*

Die Fähigkeit von Granulozyten, in vivo Keime intrazellulär aufzunehmen und abzutöten, kann auch in vitro über die Abtötungsrate von Bäckerhefezellen gemessen werden.

In 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen wurden als Doppelansatz jeweils gegeben :

	Probe	Kontrolle
62 μ l Hefesuspension (7×10^6 /ml)	+	+
62 μ l autologes Plasma	+	+
62 μ l HBSS	+	+
62 μ l Granulozytensuspension (7×10^6 /ml)	+	-

Bei 37°C unter Schütteln (120 rpm) wurde 1 Std. inkubiert, danach jeweils zugefügt :

62 μ l Na-Desoxycholat (2,5%, pH 8,7)	+	+
1 ml eiskaltes Methylenblau 0,01%	+	+

Nach 10 minütiger Zentrifugation der Proben bei 4°C mit 500 x g wurden die Überstände verworfen und das Pellet im verbliebenen Volumen resuspendiert.

Unter dem Mikroskop bei 400 facher Vergrößerung konnte nun auf einem Objektträger oder in der Zählkammer der Prozentsatz der abgetöteten (= blauen) Hefezellen bestimmt werden.

Dazu wurde von ca.300 ausgezählten Zellen die Anzahl der angefärbten Hefen festgestellt.

Nach Umrechnung durch die Formel:

$$\% = \frac{\text{Zahl der angefärbten Zellen} \times 100}{\text{Gesamtzahl der ausgezählten Zellen}}$$

wurden die Kontrollwerte von den Versuchswerten abgezogen.

3.5.5. Phagozytose-Tests mittels Flow-Cytometrie

Die Versuchsansätze gliedern sich in zwei Teile:

A : Nach Lysis der Granulozyten kann über eine selektive Lebend-Tot-Färbung mit fluoreszierendem Propidium-Jodid der Prozentsatz der abgetöteten Mikroorganismen im Cytofluorographen bestimmt werden .

B : Mit FITC-markierten Partikeln soll die Verteilung innerhalb der Granulozyten dargestellt werden.

3.5.5.1. Phagozytose von *Saccharomyces cerevisiae*

A: In 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen wurden in Mehrfachansätzen jeweils gegeben:

	Probe	Kontrolle
100 μ l Hefesuspension (1×10^6 /ml)	+	+
100 μ l autologes Plasma	+	+
100 μ l HBSS	+	++
100 μ l PMN (1×10^6 /ml)	+	-

Bei 37°C unter Schütteln (120 rpm) wurde eine Stunde inkubiert, und danach die Zellen mit 100 μ l kalter Na-Desoxycholat-Lösung (2.5%, pH 8,7) lysiert.

Zur Auflösung der Granulozyten-DNA wurde nun 1ml einer 37°C warmen DNase-Lösung (1 mg in 100 ml PBS) zugegeben und unter periodischem Schütteln 5 min inkubiert.

Sofort danach wurde in der Källezentrifuge bei 4°C 10 min mit 800 x g zentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1ml kaltem PBS o. Ca^{++} und Mg^{++} resuspendiert.

Fünf Minuten nach der Zugabe von 30 μ l Propidium-Jodid konnte der Prozentsatz der rot-fluoreszierenden (=abgetöteten) Hefezellen an der Gesamtzahl der gemessenen Hefen im Ortho-Spektrum III bestimmt werden.

B: In 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen wurde jeweils gegeben:

100 μ l FITC markierte Bäckerhefe (5×10^6 /ml)

100 μ l autologes Plasma

200 μ l HBSS

100 μ l PMN (1×10^6 /ml)

Nach einer Stunde Inkubation bei 37°C unter Schütteln (120 rpm) wurde 1ml kaltes PBS o.Ca⁺⁺ und Mg⁺⁺ zugegeben und die Proben bis zum Messen auf Eis gestellt.

Im Cytofluorographen konnte der Anteil grün fluoreszierender (=phagozytierender) Granulozyten bestimmt und die Fluoreszenzverteilung dargestellt werden.

4. UNTERSUCHUNGEN UND ERGEBNISSE

4.1. Chemilumineszenz

4.1.1. Chemilumineszenz von isolierten Zellen

Luminol-abhängige Chemilumineszenz ist in erster Linie eine Folge der Entstehung von bakteriziden Sauerstoffradikalen im Granulozyten. Inwieweit bei Messungen im Vollblut auch andere Zellen mitbeteiligt sind, wurde über die Stimulierungsfähigkeit von isolierten Zellen mit Phorbol-Myristat-Acetat (PMA) untersucht.

Aus Vollblut wurden von fünf Tieren polymorphkernige Granulozyten, mononukleäre Zellen und Thrombozyten isoliert und mit PMA stimuliert.

Tab. 1 a-c gibt die Meßergebnisse von Zellzahlen an, wie sie normalerweise in 1 ml Vollblut enthalten sind.

Tab. 1a : Chemilumineszenz von isolierten Granulozyten.

Werte als Integr.cpm x 10 ³ / 9 x 10 ⁶ PMN / 20 min.			
Tier	stimuliert	spontan	Differenz
1	2 420 734	1 013 014	1 407 720
2	1 629 471	14 173	1 615 244
3	1 060 508	117 067	943 441
4	1 215 551	23 700	1 191 851
5	1 155 436	26 170	1 129 266

Tab. 1b : Chemilumineszenz von isol.mononukleären Zellen

Werte als Integr.cpm x $10^3 / 6 \times 10^6$ Zellen / 20 min.

Tier	stimuliert	spontan	Differenz
1	11 030	14 185	neg.
2	7 470	2 210	5 260
3	27 745	4 130	23 615
4	16 350	2 240	14 110
5	24 620	2 620	22 000

Tab. 1c : Chemilumineszenz von isol.Thrombozyten

Werte als Integr.cpm x $10^3 / 3 \times 10^8$ Thrombozyten/20min.

Tier	stimuliert	spontan	Differenz
1	6 550	3 440	3 110
2	9 390	4 340	5 050
3	4 460	3 060	1 400
4	6 010	3 980	3 030

Die Thrombozyten-Chemilumineszenz wurde noch näher auf Serum- und Ioneneinflüsse hin untersucht und ist in Tab. 1d zusammengefaßt . Dazu wurden sowohl thrombozytenreiches Plasma, als auch isolierte Thrombozyten ($5 \times 10^7 / \text{ml}$) mit PMA stimuliert. Die Ergebnisse lassen keine Serumabhängigkeit erkennen, zeigen aber die Notwendigkeit des Vorhandenseins von Ca^{++} und Mg^{++} .

Tab. 1d : Chemilumineszenz von Thrombozyten

Werte als Integr.cpm $\times 10^3 / 6 \times 10^6$ Zellen / 20 min.

	Tier	stimuliert	spontan	Differenz
thrombozytenreiches Plasma	1	401	195	206
	2	306	188	118
isol.Thrombozyten + Serum	1	374	215	159
	2	278	233	45
isol. Thrombozyten	1	412	330	182
	2	446	306	140
isol.Thrombozyten + EDTA	1	247	222	25
	2	203	255	neg.

Den gleichgearteten Verlauf der Chemilumineszenz-Antwort zwischen Granulozyten und Thrombozyten nach Stimulierung zeigt Abb.5 .

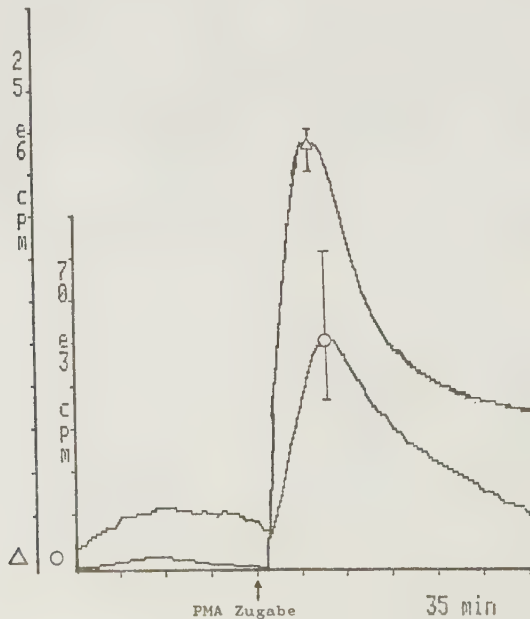


Abb. 5 : Vergleich im Verlauf der Chemilumineszenz nach Stimulierung mit Phorbol-Myristat-Acetat.

Δ = Granulozyten, $\circ$ = Thrombozyten

Abb. 6 demonstriert die dominierende Rolle der granulozytären Chemilumineszenz beim Vergleich der Werte von Tab. 1a-c.

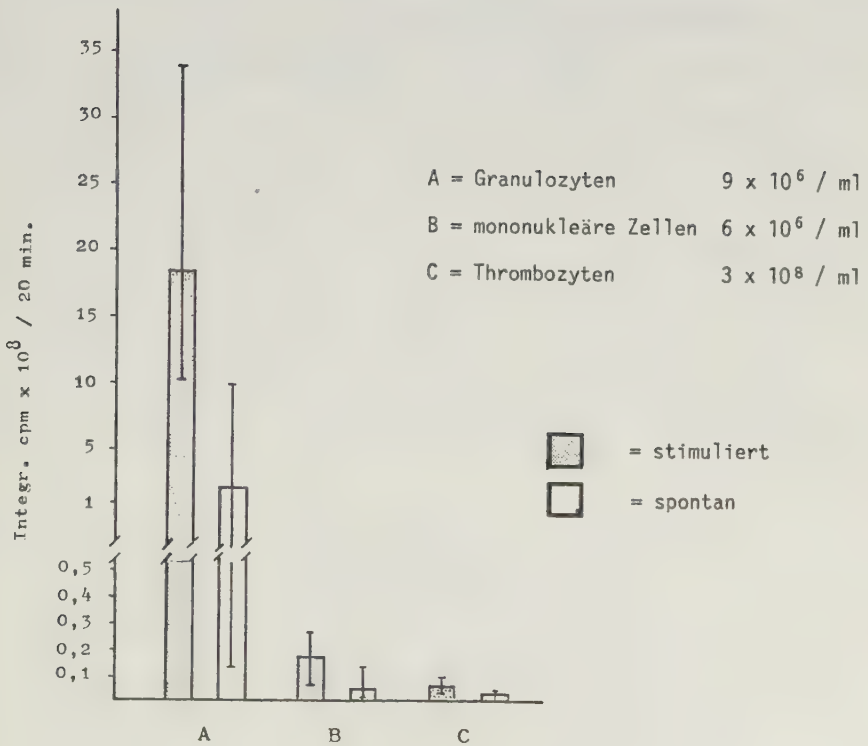


Abb. 6 : Chemilumineszenz von isolierten Zellen

4.1.2. Messungen in verdünntem Vollblut (1:10)

Ein Sechsfach-Ansatz einer Vollblutprobe wurde gemessen und die Zahl der vorhandenen Granulozyten bestimmt. Der Mittelwert der Proben ($= 1810 \text{ Integr. cpm} \times 10^3$) wurde auf die Zahl von 9×10^6 Granulozyten hochgerechnet ($= 22308 \text{ Integr. cpm} \times 10^6$).

In Abb. 7 ist der Chemilumineszenz-Verlauf bei Stimulierung ($t=0$) in verdünntem Vollblut dargestellt.

Der Vergleich mit den Chemilumineszenz-Werten von isolierten Zellen (Tab.1a) läßt vermuten, daß nur ca. 2% der emittierten Lichtcounts bei Vollblut tatsächlich gemessen werden können. 98 % dürften überwiegend durch das Hämoglobin der Erythrozyten gequenchet (abgefangen) werden.

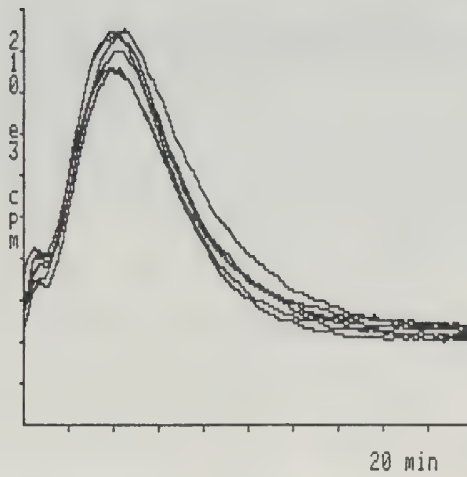
Abb. 7 (rechts) : Chemilumineszenz von Vollblut

Sechs Proben können gleichzeitig gemessen werden (Channel 1-6). Nach Stimulierung mit Phorbol-Myristat-Acetat bei $t=0$, ist über die Zeit von 20 Minuten der Verlauf der Chemilumineszenz-Antwort zu sehen. Im vorliegenden Fall wurde ein identischer sechsfach-Ansatz einer Vollblutprobe gemessen :

Nach ca. 4 Minuten (T.Max) ist bei allen Proben der Kurvenhöhenpunkt (Peak CPM) erreicht. Die halbe Anstiegszeit (T.HALF MAX.) zu diesem Punkt ist in allen Ansätzen fast identisch.

Für die Auswertung der Proben wurde das Integral der Kurve (INT.CPM) herangezogen.

Das Beispiel dieses Sechsfach-Ansatzes ($\text{Int.cpm} \bar{x} = 1810 \pm 100$) zeigt zugleich die Reproduzierbarkeit der Messung im Vollblut.



CHANNEL	INT. (CPM)	PEAK (CPM)	T. HALF MAX. (RISE)	T. MAX
1	1650	179	1.5	3.7
2	1954	201	1.5	4.4
3	1860	199	1.5	4.2
4	1789	189	1.5	4.2
5	1785	198	1.5	4
6	1819	180	1.1	4.2

INTEGRATION TIME FROM 0 TO 20 MIN
ALL CPM-VALUES X1000

Abb. 7 : Chemilumineszenz von Vollblut

4.1.3. Ergebnisse der Vollblutmessungen

Die Messergebnisse von 30 Tieren sind in Tab.2 dargestellt. Dabei sind die Daten der Vollblutmessung, Zahl der im Ansatz vorhandenen Granulozyten (* = $PMN \times 10^6 / 100 \mu l$) und die auf die standardisierte Zellzahl bereinigten Werte aufgeführt.

Tab.2 Ergebnisse der Chemilumineszenz in verdünntem Vollblut

Tier	* PMN	CL-Werte Integr.cpm x 1000 bezogen auf				
		Vollblut		7×10^6 PMN		
		stimuliert	spontan	stimuliert	spontan	Differenz
1	0,88	4 294	1 394	34 156	10 730	23 426
2	1,07	2 382	1 508	15 583	9 865	5 718
3	1,49	5 585	2 193	26 283	10 302	15 981
4	0,95	3 334	926	24 566	6 823	17 734
5	0,43	2 679	312	43 611	5 079	38 532
6	0,45	1 874	281	29 151	4 371	24 780
7	0,45	2 528	287	39 324	4 464	34 860
8	0,54	3 132	405	40 600	5 250	35 350
9	0,29	1 996	701	49 197	17 278	31 919
10	0,62	2 584	1 073	29 411	12 213	17 198
11	0,49	3 307	1 512	47 728	21 823	25 905
12	0,67	1 978	756	20 604	7 875	12 729
13	0,71	3 372	341	33 245	3 361	29 884
14	1,25	4 474	688	25 065	3 852	21 213
15	0,80	5 349	3 001	46 803	26 285	20 545
16	0,68	2 686	1 134	27 639	11 673	15 966
17	0,76	5 588	1 142	51 468	10 518	40 950
18	0,52	4 002	971	53 873	13 071	40 802
19	0,80	4 275	1 072	37 409	9 380	28 029
20	0,66	2 632	939	27 915	9 959	17 956
21	0,86	4 767	526	38 801	4 281	34 520
22	1,12	5 189	434	32 434	2 712	29 719
23	0,98	2 674	900	19 100	7 071	12 029
24	1,25	5 868	876	32 860	4 905	27 955
25	0,4	2 163	626	37 852	10 955	26 897
26	0,81	3 287	900	28 371	7 768	20 603
27	0,99	3 987	1 593	28 190	11 263	16 927
28	0,91	2 695	274	20 845	2 119	18 726
29	0,92	4 245	1 269	32 159	9 613	22 546
30	0,90	4 022	1 060	31 289	8 245	23 044

4.2. Reduktion von Nitroblau-Tetrazolium (NBT)-Salz

Nitroblau-Tetrazolium wird von phagozytierenden Granulozyten aus seinem gelben löslichen Zustand in das blau-schwarze und schwer-lösliche Formazan reduziert. Dafür wird in erster Linie das hoch-reaktive Superoxyd-Anion verantwortlich gemacht, das von stimulierten Granulozyten zur Abtötung der aufgenommenen Erreger gebildet wird. Die Menge des reduzierten blauen Farbstoffes ist somit proportional zur bakteriziden Kapazität der Zellen.

Die Stimulierung erfolgte mit Zymosan, einem hochgereinigten Bestandteil der Zellwand von *Saccharomyces cerevisiae*.

In Tab. 3 sind die Ergebnisse der Untersuchung von 30 Tieren dargestellt. Dabei wurde von jeweils einem Dreifachansatz der Mittelwert (mit Standardabweichung) gebildet, die Messwerte sind definiert als :

$OD/7 \times 10^6 \text{ PMN} / 5 \text{ min. in } 5 \text{ ml N-N-Dimethylformamid.}$

Tab.3 : Reduktion von Nitroblau-Tetrazolium

Tier	stimuliert	$\pm SD$	spontan	$\pm SD$	Differenz
	$\bar{x}$		$\bar{x}$		
1	0.214	0.022	0.157	0.029	0.057
2	0.204	0.017	0.175	0.018	0.029
3	0.214	0.036	0.172	0.056	0.042
4	0.242	0.032	0.122	0.008	0.120
5	0.194	-	0.161	-	0.033
6	-	-	-	-	-
7	0.237	-	0.128	-	0.109
8	0.230	0.01	0.224	-	0.006
9	0.198	0.008	0.139	0.021	0.059
10	0.148	0.019	0.096	0.013	0.052
11	0.167	0.041	0.134	0.014	0.033
12	0.153	0.021	0.132	0.018	0.021

Fortsetzung Tab. 3

Tier	stimuliert	± SD	spontan	± SD	Differenz
13	0.186	0.005	0.168	0.054	0.018
14	0.221	0.016	0.106	0.014	0.115
15	0.234	0.018	0.169	0.001	0.065
16	0.251	0.016	0.178	0.013	0.073
17	0.237	0.009	0.112	0.016	0.125
18	0.231	-	0.175	0.052	0.056
19	0.228	0.005	0.143	0.024	0.085
20	0.201	0.033	0.128	0.031	0.073
21	0.215	0.012	0.135	0.003	0.080
22	0.210	0.027	0.122	0.013	0.088
23	0.157	0.018	0.130	0.014	0.027
24	0.182	0.032	0.150	0.024	0.032
25	0.209	0.008	0.156	0.014	0.051
26	0.224	0.002	0.136	0.021	0.088
27	0.152	0.010	0.094	0.012	0.058
28	0.196	0.011	0.128	0.017	0.068
29	0.197	0.027	0.150	0.002	0.047
30	0.230	0.020	0.175	0.029	0.055

4.3. Stimulierung des Glucose-1-14C Stoffwechsels

Die Phagozytosefähigkeit von Granulozyten wurde über den Anstieg des Glucose-1-14C Stoffwechsels nach Stimulierung mit *Staphylococcus epidermidis* bestimmt. Das dadurch gebildete $^{14}\text{CO}_2$ wurde im β -Zähler gemessen.

In Tab.4 sind die Ergebnisse von 30 Tieren dargestellt. Aus stimulierten Proben (P) zu unstimulierten Kontrollen (K) wurde ein Quotient P/K gebildet.

Tab. 4 Stimulierung des Glucose-1-14C Stoffwechsels.

Tier	cpm stim.Probe	± SD	cpm Kontrolle	± SD	Quotient P/K
1	207.1	39.0	79.5	12.4	2.60
2	167.9	17.3	76.8	15.6	2.18
3	306.5	22.7	91.7	12.8	3.34
4	234.7	17.7	63.9	20.5	3.67
5	319.3	79.0	97.7	6.8	3.26
6	200.6	23.2	70.8	11.3	2.83
7	209.8	24.9	61.9	5.0	3.83
8	168.3	29.2	59.2	7.4	2.84
9	77.3	18.1	42.5	6.3	1.81
10	125.7	13.4	37.1	4.7	3.38
11	110.6	14.9	45.3	4.0	2.44
12	168.8	19.5	35.2	6.8	4.79
13	143.4	25.2	54.3	10.3	2.64
14	206.3	26.9	65.3	2.4	3.16
15	171.6	40.9	85.1	7.1	2.01
16	118.8	12.2	75.9	11.0	1.56
17	320.7	53.2	77.9	9.6	4.10
18	231.4	44.4	70.7	10.6	3.27
19	294.0	48.9	76.2	12.6	3.85
20	217.1	69.5	81.8	6.6	2.65
21	730.1	128.7	139.6	36.1	5.22
22	1402.0	258.5	153.6	17.7	9.12
23	799.9	126.4	235.9	37.0	3.39
24	2216.9	606.7	255.3	51.2	8.68
25	713.9	291.5	130.7	18.6	5.46
26	428.6	99.0	190.6	35.4	2.24
27	447.6	151.3	258.6	55.2	1.73
28	676.1	197.1	114.0	60.5	5.90
29	882.8	37.0	195.8	42.6	4.50
30	385.0	52.3	145.3	35.7	2.65

4.4. Abtötung von *Saccharomyces cerevisiae*

Im sogenannten direkten Test wurde die Fähigkeit von Granulozyten gemessen, Bäckerhefezellen abzutöten. Die Werte in Tab.5 geben den Prozentsatz der nach einer Stunde abgetöteten Hefezellen an. Das Zahlenverhältnis von Hefen zu Granulozyten betrug 1:1. Die Kontrolle stellt die serumabhängige Lysis der Hefezellen nach einstündiger Inkubation dar.

Tab. 5 Ergebnisse des Hefe-Phagozytostests

Tier	Probe	Kontrolle	Differenz
1	86.0	34.3	51.7
2	69.0	31.7	37.3
3	64.3	51.3	13.0
4	—	—	—
5	56.0	32.2	23.8
6	65.9	35.7	30.2
7	50.7	34.8	15.9
8	55.0	34.0	21.0
9	52.7	3.0	49.7
10	55.2	5.3	51.9
11	49.6	5.2	44.4
12	49.2	4.6	44.6
13	33.5	6.3	27.2
14	38.3	12.4	25.9
15	50.9	8.3	42.6
16	59.9	9.3	50.6
17	41.5	2.7	38.8
18	37.2	3.3	33.9
19	39.1	2.3	36.8
20	41.3	2.6	38.7
21	47.6	2.4	45.2
22	54.6	3.0	51.6
23	42.7	4.0	38.7
24	71.4	5.0	66.4
25	79.7	2.3	77.4
26	34.7	3.0	31.7
27	52.2	1.0	51.2
28	40.9	1.3	39.6
29	42.8	1.3	41.6
30	47.3	3.2	44.0

4.5. Vergleich der Ergebnisse

Die Phagozytosefähigkeit von Granulozyten wurde für jedes Tier mit vier verschiedenen Meßmethoden vergleichend untersucht. In Tab.6 sind die Ergebnisse zusammengefaßt gegenübergestellt.

Tab. 6 Zusammenfassung der Werte von Tab. 2 bis Tab. 5

Tier	Hefe-Test *	NBT-Test *	Chemilumineszenz *	Gluc.1-14C-Test *
1	51.7	0.057	23 426	2.6
2	37.8	0.057	5 718	2.18
3	13.0	0.042	15 981	3.34
4	—	0.120	17 734	3.67
5	23.8	0.033	38 532	3.26
6	30.2	—	24 780	2.83
7	15.9	0.109	34 860	3.38
8	21.8	0.006	35 350	2.84
9	49.7	0.059	31 919	1.81
10	51.9	0.052	17 198	3.38
11	44.4	0.033	25 905	2.44
12	44.6	0.024	12 792	4.79
13	27.2	0.018	29 884	2.64
14	25.9	0.115	21 213	3.16
15	42.6	0.065	20 545	2.01
16	50.6	0.073	15 966	1.56
17	38.8	0.125	40 950	4.1

Fortsetzung Tab. 6

Tier	Hefe-Test*	NBT-Test*	Chemilumineszenz *	Gluc.1-14C-Test *
18	33.9	0.056	40 802	3.27
19	36.8	0.085	28 029	3.85
20	38.7	0.073	17 956	2.65
21	45.2	0.080	34 520	5.22
22	51.6	0.088	29 719	9.12
23	38.7	0.004	12 029	3.39
24	66.4	0.032	27 955	8.68
25	77.4	0.032	26 897	5.46
26	31.7	0.088	20 603	2.24
27	51.2	0.058	16 927	1.92
28	39.6	0.068	18 726	5.90
29	41.5	0.047	22 546	4.50
30	44.0	0.055	23 044	2.02

* Werte definiert als:

Hefe-Test : Prozent abgetöteter Hefezellen bei einem
Verhältniss PMN zu Hefe von 1 : 1

NBT-Test : $OD / 7 \times 10^6 \text{ PMN} / 5 \text{ min}$ in 5 ml N-N-Dimethylformamid

Chemilumineszenz : $cpm \times 10^6 / 7 \times 10^6 \text{ PMN} / 20 \text{ min.}$

Gluc.1-14C-Test : Quotient von stimulierter Probe (P) zu
unstimulierter Kontrolle (K)

Die Berechnung der Korrelationen zwischen den einzelnen Ergebnissen von Tab.6 ist in Tab.7 zusammengefaßt. Die Werte geben den Korrelationskoeffizienten r an, n ist die Anzahl der Wertepaare.

Tab. 7 : Korrelation zwischen den verschiedenen Phagozytose-Tests

Hefe-Test / NBT-Test	$r = - 0,1239$	$n = 28$
Hefe-Test / Chemilumineszenz	$r = - 0,1401$	$n = 28$
Hefe-Test / Gluc.14-C Test	$r = + 0,3736$	$n = 29$
NBT-Test / Chemilumineszenz	$r = + 0,1267$	$n = 29$
NBT-Test / Gluc.14-C Test	$r = + 0,0246$	$n = 29$
Chemilumineszenz/Gluc.14-C Test	$r = + 0,1969$	$n = 30$

Die stärkste Korrelation zeigte sich zwischen Hefe-Test und Glucose-1-14C Test. Eine Berechnung der Signifikanz der Korrelation zwischen Hefe-Test und Glucose-1-14-C Test mit dem "t-Test" ergab : $t = 2,09$, $P < 5\%$

Schwächere positive Korrelationen zeigten sich zwischen Glucose-1-14C Test und Chemilumineszenz, sowie zwischen Chemilumineszenz und NBT-Test. Keine Korrelation der Ergebnisse besteht zwischen Hefe-Test und NBT-Test, bzw. Hefe-Test und Chemilumineszenz.

4.6. Flow-Cytometrie zur Messung der Phagozytose

4.6.1. Darstellungsmöglichkeiten von Subpopulationen phagozytierender Granulozyten

Im Cytofluorographen kann anhand der Fluoreszenzintensität bei phagozytierenden Zellen unterschieden werden, wie viele Partikel pro Zelle phagozytiert wurden.

Größte Bedeutung kommt dabei naturgemäß der Methodik der Fluoreszenzmarkierung der Partikel zu. Nur eine gleichmäßige Markierung gewährleistet eine meßbare lineare Zunahme der Fluoreszenzintensität wenn zwei, drei, oder mehr solcher Partikel phagozytiert wurden.

In Vorversuchen wurden im Fluoreszenzmikroskop verschiedene Farbstoffe verglichen. Am geeignetsten erwies sich dabei die Markierung mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC). Gegenüber "Lebend-Farbstoffen" wie Acridin-Orange (AO) und Fluorescein-Diacetat (FDA) bietet FITC den Vorteil, daß es die verwendeten Mikroorganismen *Saccharomyces cerevisiae* und *Staphylococcus epidermidis* unabhängig von deren momentanen Stoffwechselsituation gleichmäßig anfärbt.

Eine weitere Voraussetzung zur Auswertung im Cytofluorographen besteht darin, daß zwischen freien und von Granulozyten phagozytierten Partikeln unterschieden werden kann.

Im Laserstrahl werden alle Zellen auch nach Größe und optischer Dichte vermessen und auf einem Bildschirm angezeigt. Durch einen veränderbaren Ausschnitt ("Trigger Region") kann nun die Zellpopu-

lation ausgewählt werden, die untersucht werden soll. Staphylococcus und Latex-Partikel sind durch die völlig unterschiedliche Größe zu Granulozyten problemlos auseinanderzuhalten. Freie, nicht phagozytierte Hefen unterscheiden sich in der optischen Dichte von Granulozyten so deutlich, daß auch hier eine eindeutige Trennung erfolgen kann (vgl. Abb 8).

Der Cytofluorograph erlaubt nun in einem getrennten Bild ("Histogramm") die Fluoreszenzdarstellung der vorher durch die "Trigger-Region" ausgewählten Zellpopulation. Entlang der X-Achse wird die Intensität aufgetragen, wodurch Granulozyten unterschieden werden können, die eine unterschiedliche Zahl von Partikeln aufgenommen haben.

Abb. 9 zeigt die Darstellungsmöglichkeiten von solchen Granulozytensubpopulationen. Als Vergleich zu Staphylococcus und Hefen wurden käufliche Latex-Partikel verwendet.

Dabei zeigte sich, daß sauber getrennte "Peaks" nur mit Latex-Partikeln darzustellen sind. Die Ursachen liegen wohl in einer natürlichen Variation der Zellgrößen der verwendeten Mikroorganismen mit einer daraus resultierenden unterschiedlichen Fluoreszenzintensität.

Tab. 8 zeigt die Größenabweichungen nach Vermessung im Cytofluorographen. Die Angaben sind keine Absolutwerte sondern willkürliche Einteilungen, d.h. die Werte von Staphylococcen und Hefen können nicht direkt verglichen werden. Aussagekräftig ist jedoch die Standardabweichung, die zeigt, wie stark die Zellgrößen in sich variieren.

Tab. 8 Größenabweichungen der verwendeten Fluoreszenzpartikel

Latex	$\pm$ SD	Sacc.cer. $\pm$ SD		Staph.epid $\pm$ SD	
1,0 μm (*)	0,03 μm	52,1	10,4	125,5	32,8

* = laut Hersteller

Abb. 8 zeigt zusammenfassend die Möglichkeiten der Phagozytosemessung am Ortho-Spektrum-III .

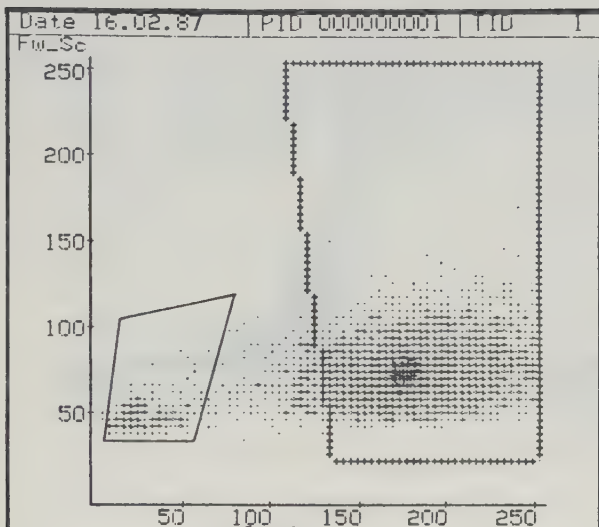
Abb. 8 (rechts) : Phagozytosemessung im Cytofluorographen.

Im "Cytoogramm" werden Zellen nach Größe (Fw.Sc. = Y-Achse) und optischer Dichte (Rt.Sc. = X-Achse) vermessen. Durch einen veränderbaren Ausschnitt ("Trigger-Region") kann die Zellpopulation angewählt werden, die untersucht werden soll.

Freie Hefen (—Feld) und Granulozyten (+++ Feld) können vollkommen getrennt werden.

Im "Histogramm" kann die Fluoreszenz der Zellen, die innerhalb der "Trigger-Region" liegen, dargestellt werden. Granulozyten mit einer unterschiedlichen Zahl aufgenommener Partikel unterscheiden sich durch ihre Fluoreszenzintensität (X-Achse). Durch zwei veränderbare Skalenbereiche der X-Achse (Region A und B) lässt sich die darüberliegende Zellzahl berechnen.

Im abgebildeten "Histogramm" kann in der Fluoreszenzverteilung ein erster abgesetzter "Peak" erkannt werden, der diejenigen Granulozyten darstellt, die nur eine Hefezelle aufgenommen haben (vgl. Abb. 9). Dieser Bereich wurde als Region A eingestellt. In Region B sind hier die Granulozyten, die zwei und mehr Hefezellen phagozytiert haben.



Cytogramm:

Right Scatter
(optische Dichte)
gegen Forward Scatter
(Zellgröße)



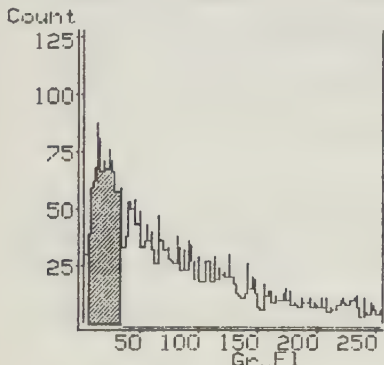
=Granulozyten



=Hefezellen

Ch A vs B

	Channel A	Channel B
Cnt Tot	6992. Sel	6409. Sel
Mean	207.1	97.6
St_Dev	39.4	47.2
CV	19.0	48.3
Cluster Slope	0.68	
Cluster Covariance	1054.47	
Correlation Coeff	0.567	



Histogramm:

Fluoreszenz der
phagozytierenden
Granulozyten



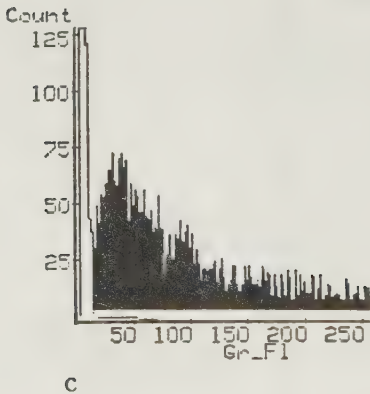
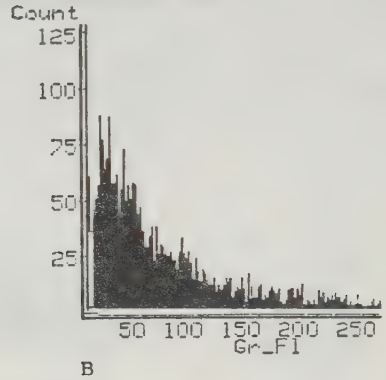
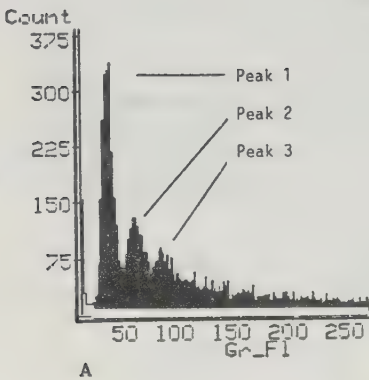
=Region A



=Region B

Ch D Hist

	Region A	Region B
Tot Count	958.	2896.
Mean Ch	20.0	147.1
Std Dev	7.9	81.8
CV %	39.7	55.6
% Tot	24.9	75.1
A+B Total Count	3854.	
B-A Count	1938.	
Dead Time sec	0.11	



- A : Latex-Partikel
B : *Saccharomyces cerevisiae*
C : *Staphylococcus epidermidis*

Durch die einheitliche Größe und homogene Fluoreszenz von Latex-Partikeln sind Granulozyten mit einem, zwei, oder drei solcher Partikel deutlich durch ihre unterschiedliche Fluoreszenzintensität voneinander abgesetzt (A).

Bei Sacc. cer. (B) und Staph.epid. (C) sind diese "Peaks" undeutlicher.

Abb. 9 : Darstellungsmöglichkeiten von Subpopulationen phagozytischer Granulozyten mit verschiedenen Stimulantien.

4.6.2. Möglichkeiten der Messung von abgetöteten

Saccharomyces cerevisiae

Prinzipiell ist es möglich, Keime, die vorher zur Phagozytose angeboten wurden, nach deren Freisetzung durch Lysis der Granulozyten, in einer Lebend-Tot-Färbung selektiv zu unterscheiden, sofern die räumliche Struktur der abgetöteten Erreger noch erhalten ist. Der Farbstoff Propidium-Jodid dringt nur durch die Zellwand von toten Zellen, färbt deren DNA rot-fluoreszierend an und ermöglicht so eine Auswertung im Cytofluorographen.

Dieses zum Hefe-Test (vgl. 3.6.4.) analoge Versuchssystem ist so im Cytofluorograph zunächst nicht ohne weiteres auswertbar.

Nach der Lysis der Granulozyten kommt es zur Freisetzung granulocyitärer DNA, die teilweise massive Verklumpungen verursacht, und schon bei der mikroskopischen Auszählung der abgetöteten Hefezellen erhebliche Schwierigkeiten bereitete. Eine Auswertung im Cytofluorographen wäre so undenkbar.

Es wurde nun versucht, diese DNA durch Zugabe von boviner Pankreas-DNAse enzymatisch zu spalten. Fünfminütiges Einwirken bei 37°C, so zeigte sich, genügte vollkommen, um damit die Verklumpung zu verhindern.

Die Einflüsse dieses Enzyms auf die freigesetzten Mikroorganismen wurden mit folgendem Versuch bestimmt:

Je 100 µl einer Mischung aus vitaler und inaktivierter (4:1) Bäckerhefelösung (1×10^6) wurde im Doppelansatz in 1,5 ml

Eppendorf-Röhrchen gegeben. Anschließend wurde je 1ml einer DNase-Lösung (1mg/100 ml PBS) zugefügt und unterschiedlich lange bei 37°C inkubiert, die Proben wurden noch für weitere 45 min. auf Eis gestellt. Die Kontrollen enthielten nur Hefezellen und PBS.

Im Cytofluorographen wurde dann sowohl die absolute Zellzahl (Zahl der Hefezellen in 81 μ l), als auch der Prozentsatz der rot-fluoreszierenden Hefen bestimmt.

In Tab.9 sind die Ergebnisse aufgeführt. Trotz der unverhältnismäßig langen enzymatischen Einwirkungszeit von 25 min., ist gegenüber den Kontrollen keine signifikante Änderung festzustellen. Die geringen Schwankungen liegen fast noch innerhalb des Meßfehlers.

Tab. 9 Einfluss der DNase auf Hefezellen (Doppelbestimmung)

Zeit	Zellzahl in 81 μ l	% Rote-F1	Zellzahl	% Rote-F1
Kontrolle				
5 min.	8624	17.9	8430	17.1
Probe				
5 min.	8299	16.7	8201	16.5
10 min.	8065	15.8	7771	16.8
15 min.	8298	16.0	8009	17.4
20 min	7812	16.2	7729	16.8
25 min.	8469	16.7	8391	16.9

Bei bis zu 25 minütiger Einwirkungszeit der bovinen Pankreas-DNase ist kein Einfluß dieses Enzyms auf Hefezellen zu erkennen. Sowohl die absolute Zahl der in der Probe vorhandenen Hefen, als auch der Prozentsatz der rot-fluoreszierenden Hefen bleibt nahezu unverändert. Hieraus folgt, daß die DNase weder auf lebende, noch auf abgetötete Hefezellen eine erkennbare Wirkung zeigt. Das Enzym ist damit in der Lage, die freigesetzte granulozytäre DNA soweit zu spalten, daß keine Verklumpungen mehr auftreten. Durch die fehlende Wirkung auf Hefezellen wird dadurch nicht die Abtötungsrate der Granulozyten verfälscht.

4.6.3. Phagozytose-Test mit *Saccharomyces cerevisiae*

Es wurde nun versucht, mit einem Phagozytose-Test zwei unterschiedliche Kriterien darzustellen:

Methodik:

A: Die bakterizide Kapazität wird gemessen, indem nach Lysis der Granulozyten der Prozentsatz der abgetöteten Hefezellen bestimmt wird.

B: Die Phagozytosekapazität wird gemessen, indem die Aufnahme von FITC-markierten Hefezellen in Granulozyten bestimmt wird.

Im Folgenden sind die Ergebnisse dieses kombinierten Tests von vier Tieren dargestellt.

Tab. 10 zeigt die Abtötung von Hefezellen.

Proben und Kontrollen (ohne Granulozyten) wurden in jeweils sechs-fachen Ansätzen gemessen, die Zahlenwerte geben den Prozentsatz abgetöteter Hefezellen mit Standardabweichung (SD) an.

Tab.10 Abtötung von Hefezellen durch Granulozyten (n=6)

Tier	Probe	$\pm$ SD	Kontrolle	$\pm$ SD	Differenz
1	53,7	0,7	4,1	1,5	49,6
2	59,9	4,5	3,8	0,9	56,1
3	47,9	7,1	3,5	0,9	44,4
4	51,3	4,1	7,2	1,9	44,1

Aus Tab.10 geht zugleich hervor, mit welcher hoher Genauigkeit der Prozentsatz abgetöteter Hefezellen bestimmt werden kann. Gegenüber der Auszählung im Mikroskop besticht diese Methode auch durch die Berücksichtigung sehr hoher Zellzahlen (im Cytofluorographen wurden jeweils über zehntausend Hefezellen ausgezählt).

Bei den gleichen Tieren wurde nun die Verteilung der FITC-markierten Hefezellen innerhalb der Granulozytenpopulation festgestellt. Es wurde zwischen einer, zwei, drei und mehr Hefezellen pro Granu-

lozyt unterschieden. Die Zahlenwerte in Tab.11 geben den Prozentsatz der insgesamt beteiligten Granulozyten an, zugleich sind die Ergebnisse aus Tab.10 noch hinzugefügt.

Tab.11 gibt somit die Ergebnisse einer umfassenden Phagozytosemessung von Granulozyten bei vier verschiedenen Schweinen an.

Tab.11 : Phagozytose von *Saccharomyces cerevisiae*

Schwein	% abgetötet	aufgenommene Hefezellen pro Granulozyt (Prozentsatz der Granulozyten)		
		1	2	3 und mehr
1	49,6	24,9	19,0	56,1
2	56,1	32,6	25,3	49,4
3	44,4	25,4	14,2	60,4
4	44,1	28,4	21,2	50,4

4.6.4. Möglichkeiten der Messung von abgetöteten Staphylococcus epidermidis

Anders als bei den Hefezellen bereitet im Cytofluorographen die Messung von Staphylococccen erhebliche Schwierigkeiten. Zwar ist es auch hier möglich, die abgetöteten Mikroorganismen mit Propidium-Jodid selektiv anzufärben. Die Probleme liegen aber in der Zellgröße. Partikel von der Größe um $1\mu\text{m}$ sind nur schwer vor einem

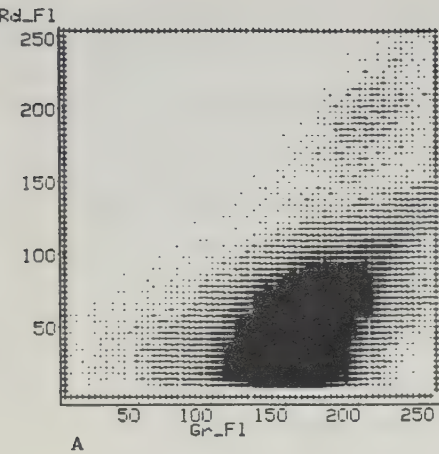
immer mehr oder weniger "verschmutzten" Hintergrund auszumachen. Mit der Anwendung der Doppelfluoreszenz wurde versucht, diese Schwierigkeit zu umgehen. Dabei wurden grüne und rote Fluoreszenz auf zwei Achsen gegeneinander aufgetragen. Lebende Zellen, die nur grün fluoreszieren, liegen dabei nahe der X-Achse, während tote, rot-fluoreszierende Zellen nahe der Y-Achse zu liegen kommen. Das Ziel ist also eine graphische Aufsplitterung der beiden Zellcluster.

Bei Geräten mit nur einem Laser, wie dem Ortho-Spektrum III, muß zudem eine Farbstoffkombination verwendet werden, die bei der gleichen Wellenlänge angeregt wird, aber ein unterschiedliches Emissionsspektrum besitzt.

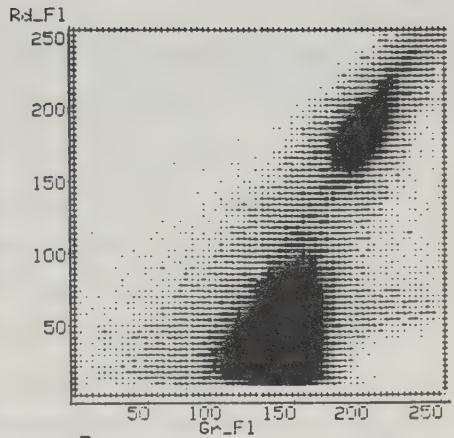
Acridin-Orange (AO) gegen Propidium-Jodid (PI) lieferte im Fluoreszenzmikroskop gute Resultate. In Abb.10 A und B, ist die Auswertung in der Doppelfluoreszenz zu sehen. Dabei wird auch gleich ein Dilemma sichtbar: Tote Staphylococcen sind mikroskopisch als rote oder orange Partikel von den vitalen grünen gut zu unterscheiden. In der Darstellung der Doppelfluoreszenz wird aber Orange noch im grünen Spektrum gemessen. Somit liegen also orange (tote) bzw. grüne (vitale) Zellen in dieser gewählten Darstellung an gleicher Stelle. Eine Lebend-Tot-Unterscheidung ist dadurch nur bedingt möglich.

Auch bei der Kombination FITC gegen PI sind die beiden Zellcluster nur unvollständig aufzutrennen (Abb.10 C und D).

Eine quantitative Bestimmung von abgetöteten Staphylococcen ist so noch nicht möglich.



A

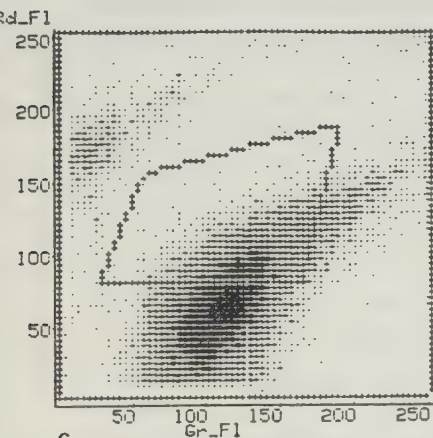


B

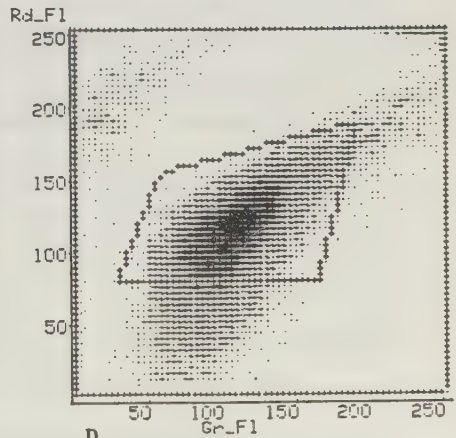
Acridin-Orange (AO) gegen Propidium Jodid (PI) :

Vitale Staph.epid. fluoreszieren grün (A)..

Inaktivierte Mikroorganismen sind rot (B oben) bzw. orange fluoreszierend. Orange wird aber noch im grünen Spektrum gemessen, diese Zellen liegen somit fast an gleicher Stelle wie die vitalen grün fluoreszierenden (B unten).



C



D

Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) gegen Propidium-Jodid (PI) :

Vitale FITC-markierte Staph.epid. fluoreszieren grün (C).

Werden sie inaktiviert, fluoreszieren sie in Anwesenheit von PI zusätzlich noch rot (D). Die beiden Zellcluster lassen sich aber nur unvollständig trennen.

Abb. 10 : Doppelfluoreszenz zur Lebend-Tot - Unterscheidung von

Staphylococcus epidermidis

5. DISKUSSION

Die Phagozytose wurde als ein Geschehen beschrieben, das sich vom ersten Kontakt der Granulozyten mit den Mikroorganismen bis zu deren Ingestion in eine Reihe von Schritten unterteilen läßt. Zur intrazellulären Abtötung der aufgenommenen Mikroorganismen stehen den Granulozyten vielfältige Mechanismen zur Verfügung, die teilweise völlig unterschiedliche biochemische Wege beschreiten.

Dieses insgesamt sehr komplexe Geschehen kann im Überblick nur mit Hilfe mehrerer konkurrierender In-vitro-Tests beurteilt werden, da jeder Test nur einen Teilkomplex dieses Ablaufes erfaßt (ROTH und KAEBERLE 1981).

In der vorliegenden Arbeit wurden bei Granulozyten von 30 Schweinen vergleichende Untersuchungen mit vier verschiedenen Phagozytose-tests unternommen.

Eine dominierende Rolle in der bakteriziden Kapazität der Granulozyten spielt der oxydative Metabolismus der Zellen (SMITH 1982). Nach Kontakt von Mikroorganismen über eine Rezeptor-Ligand-Bindung mit der Plasmamembran des Granulozyten kommt es zur Aktivierung einer NADPH-Oxydase, die nun die Reduktion von Sauerstoff zu bakteriziden Sauerstoffradikalen mit gleichzeitiger Oxydation von Glucose katalysiert.

Dieser im Laufe der Phagozytose dramatisch ansteigende Glucoseverbrauch kann auch im Vollblut erfolgreich über die Bildung von $^{14}\text{CO}_2$ aus Glucose-1- ^{14}C gemessen werden (BUSCHMANN 1973). Eine Unsicherheit stellt sicherlich der unterschiedliche Blutglucose-

spiegel dar (Klebanoff 1978). Dem muß entgegengehalten werden, daß in den gemessenen 0,2 ml Vollblut die Glucose-Konzentration zwischen 0,14 mg und 0,24 mg schwankt (SCHULZE 1980). Exogen wird aber in 1 ml HBSS mit 1mg Glucose mehr als die zehnfache Menge zugeführt. Immerhin kann nicht ausgeschlossen werden, daß der besonders hohe Quotient einiger Tiere (z.B. 24 u.26) auch auf einen Glucosemangel im Blut zurückzuführen ist, der dann die spezifische Radioaktivität der Gesamtglucose ansteigen läßt.

Bei den eigenen Untersuchungen ergaben sich interessanterweise die größten Korrelationen zwischen dieser Stimulierung des Glucose-stoffwechsels und der Abtötung von Hefezellen. Dies ist bemerkenswert, weil die Tests jeweils den Anfang bzw. das Ende des zellulären Phagozytosegeschehens erfassen. Sämtliche biochemische Abwehrmechanismen sind im Ursprung von einer Glucoseoxydation begleitet. Auch der sauerstoffunabhängige enzymatische Angriff wird erst von dem begleitenden Sauerstoff-, und damit Glucose-abhängigen System optimiert (CRAVEN et al.1986).

Die Abtötung von Mikroorganismen darf letztendlich als die Summe vieler bakterizider Mechanismen des Granulozyten angesehen werden (SASADA et al. 1980). Die enge Verwandtschaft der beiden Tests liegt möglicherweise darin, daß sie in der Lage sind, eine breite Palette von Abwehrmechanismen übergreifend zu erkennen.

Während des Phagozytosevorgangs entstehen über das instabile Superoxyd-Anion eine Reihe von Sauerstoffradikalen, die nach der Kopplung an Luminol als Lichtcounts gemessen werden können. Die Chemilumineszenz ist aber trotzdem kein eigentlicher Parameter für

den oxydativen Metabolismus des Granulozyten. De CHATELET (1982) wies die völlige Abhängigkeit der Luminol-vermittelten Chemilumineszenz von dem Enzym Myeloperoxydase (MPO) nach. Seiner Meinung nach scheint eine Verminderung der Myeloperoxydase-Aktivität größeren Einfluß auf die meßbare Chemilumineszenz zu haben als ein verringerter Anstieg des "Respiratory burst". Diese komplette Abhängigkeit macht die Chemilumineszenz eher zu einem Nachweis für die enzymatische Aktivität der Myeloperoxydase. ROSEN (1979) spricht diesem Enzym eine überragende Bedeutung für die Abtötung von Mikroorganismen zu. Beim Menschen ist die MPO-Defizienz in einem von 2100 Fällen, der am häufigsten vorkommende Defekt bei Funktionsstörungen von Granulozyten (PARRY et al. 1981). Diesbezügliche Untersuchungen liegen beim Tier nicht vor, wären aber auch aus tierzüchterischer Sicht von hohem Interesse.

Die genauen biochemischen Abläufe der Chemilumineszenz mit Luminol sind jedoch noch teilweise unklar (ZGLICZYNSKI 1985). Dies ist insofern von Bedeutung, als auch für die Reduktion von NBT zu Formazan das Superoxyd-Anion verantwortlich gemacht wird (BAEHNER 1976). Obwohl beide Tests damit funktionell eng mit diesem Sauerstoffradikal verknüpft sind, ergab sich bei den eigenen Untersuchungen nur eine schwache Korrelation der Meßergebnisse. Das gebildete Superoxyd-Anion reduziert zwar NBT zu Formazan, aber nur in Anwesenheit von Myeloperoxydase, dem limitierenden Schritt, kommt es zur Chemilumineszenz. NBT-Reduktion und Chemilumineszenz sind zwar eng mit dem oxydativen Stoffwechsel verknüpft, messen aber verschiedene Schritte dieses Komplexes (ROTH et al. 1981).

Gleiches dürfte auch für den Vergleich der Stimulierung des Glucose-1-14C Stoffwechsels und der Chemilumineszenz gelten, da auch hier nur eine schwache Korrelation festzustellen ist.

Chemilumineszenz ist somit wohl ein Phänomen, das nur innerhalb ganz spezieller Stoffwechselschritte auftritt. Zwischen der Fähigkeit von Granulozyten, verschiedene Serotypen von E.coli abzutöten, und der Messung der entsprechenden Chemilumineszenzantwort konnte auch WELCH (1980) keinerlei Korrelation feststellen. Bei den eigenen Untersuchungen wurde zwischen der Abtötung von Hefezellen und Chemilumineszenz ebenfalls keine Beziehung erkannt.

Dies zeigt die Problematik der Interpretation von Phagozytose-tests, die einerseits nur ganz spezielle biochemische Vorgänge messen, andererseits als Kriterium für die allgemeine Phagozytosefähigkeit herangezogen werden.

Die Abtötung von Mikroorganismen kann als ein Zusammenspiel aller dem Granulozyten zur Verfügung stehenden Mechanismen angesehen werden. Chemilumineszenz und Reduzierung von NBT sind dafür nur sehr spezielle Parameter, die aber das Ineinandergreifen aller bakterizider Mechanismen nicht erkennen lassen können.

Beim Zustandekommen einer Chemilumineszenz in Vollblutproben spielen die phagozytierenden Granulozyten die dominierende Rolle. Deshalb kann die Phagozytosefähigkeit der Granulozyten mittels dieser Methode auch im Vollblut gemessen werden. In eigenen Untersuchungen beim Schwein wurde zunächst die Chemilumineszenz von verschiedenen Zellfraktionen des Vollblutes untersucht. Beim Vergleich der

Ergebnisse mit isolierten Zellen zeigte sich, daß ca. 98 % der gemessenen Lichtcounts von Granulozyten stammen .

KATO et al. (1981) schlossen aus ihren Untersuchungen, daß ca. 5 % der Zymosan-induzierten Chemilumineszenz im Vollblut auf die Aktivität von Thrombozyten zurückzuführen ist. Nach Stimulierung mit Phorbol-Myristat-Acetat (PMA) kommt es zwar auch bei Thrombozyten zur Aktivierung des Stoffwechsels verbunden mit einer Degranulation (NAKA et al. 1983). Aufgrund eigener Ergebnisse dürfte die Chemilumineszenz von Thrombozyten nur zu ca. 0,5 % bei den Vollblutwerten beteiligt sein, wenn statt mit Zymosan mit PMA stimuliert wird.

Über die Chemilumineszenz von Monozyten liegen nur ungenaue Erkenntnisse vor. Da mit ihrer Isolierung aus den mononukleären Zellen offensichtlich ein Verlust ihrer Fähigkeit zur Chemilumineszenzantwort einhergeht (ERNST et al. 1984), wurde nur die gesamte Fraktion der mononukleären Zellen gemessen. Mit insgesamt 1,5 % an der Gesamtemission beteiligt, ist ihr Einfluß gering. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, daß ihre tatsächliche Aktivität im Vollblut höher liegt, da durch die verschiedenen Präparationsschritte bei der Zellgewinnung ein Teil der Monozyten möglicherweise durch Adhärenz an den Glasoberflächen der Probenröhrchen verloren ging.

Monozyten und ihre Abkömmlinge zeichnen sich zudem durch eine anders geartete Stoffwechselkinetik und damit einhergehende Chemilumineszenzantwort aus (FROMTLING et al. 1985, HOIDAL et al. 1978). So ist bei Alveolar-Makrophagen nach der Stimulierung mit PMA der

für Granulozyten charakteristische initiale explosionsartige Anstieg des Glucose- und Sauerstoffverbrauchs nicht zu beobachten. Bei diesen erfolgte nur ein stetiges Ansteigen, dessen Plateau nach 20 Minuten erreicht war (BEALL et al.1977).

Die Einflüsse der unterschiedlichen Stimulantien müssen beim Vergleich der Ergebnisse mitberücksichtigt werden. Granulozyten können ihre Antwort antigenabhängig differenzieren. BUSCHMANN (1976) wies die unterschiedliche Beeinflußbarkeit der Glucoseoxydation von Granulozyten nach, wenn mit verschiedenen Mikroorganismen stimuliert wird. WRIGHT und SILVERSTEIN (1983) schreiben hier den Rezeptoren eine besondere Bedeutung zu. Sie zeigten, daß die aktivierten Komplement-Rezeptoren C3b und C3i zwar die Ingestion verstärken, selber aber den Granulozyten zu keiner H_2O_2 -Freisetzung und damit O_2^- -Bildung anregen. Zymosan scheint in erster Linie den alternativen Weg des Komplementsystems zu aktivieren, opsoniertes Zymosan wäre somit überwiegend von C3-Liganden besetzt (CZOP 1986). Während im Chemilumineszenztest Phorbol-Myristat-Acetat (PMA) den oxydativen Stoffwechsel maximal stimuliert (SZEJDA 1984), ist opsoniertes Zymosan unter Umständen nicht im gleichen Maße fähig, die NBT-Reduktion zu provozieren. Weitergehende Untersuchungen wären hier noch von großem Interesse, denn die unterschiedliche Beeinflußbarkeit wird auch unter pharmakologischen Gesichtspunkten deutlich. Granulozyten, die mit einer relativ geringen Menge von Cytochalasin B vorbehandelt waren, zeigten eine 5 %ig reduzierte Ingestion von Hefezellen, während gleichzeitig die Freisetzung von O_2^- um 75 % vermindert war (YAMAMOTO et al. 1984).

Die funktionelle Vielfalt der bakteriziden Abwehrmechanismen des Granulozyten scheint innerhalb eines Testsystems mit am umfassendsten über die Abtötung von Hefezellen beurteilt werden zu können. Diese Methode schließt zudem die Stadien der Erkennung, Opsonierung, Adhärenz und Ingestion mit ein. Jeder Defekt in einem dieser Schritte muß letztendlich auch zu einer verminderten Abtötung führen.

Die mikroskopische Auswertung ist jedoch sehr zeitaufwendig und erlaubt nur das Auszählen von geringen Zellzahlen mit der daraus folgenden statistischen Unsicherheit. Zudem kam es nach Lysis der Granulozyten durch die freigesetzte granulozytäre DNA zu erheblichen Verklumpungen der Hefezellen. Durch die Zugabe von boviner Pankreas-DNase konnte dies erfolgreich verhindert werden. Dieses Enzym spaltet die freie DNA, ohne daß ein Einfluß auf lebende oder abgetötete Hefezellen zu erkennen war. Da mit dem Farbstoff Propidium-Jodid tote Hefezellen selektiv rot-fluoreszierend anfärbbar sind, kann eine Auswertung dieses Tests auch im Cytofluorographen erfolgen.

Diese Methode besticht wegen der Berücksichtigung großer Zellzahlen und einer geringen statistischen Abweichung. Sie ist einfach und schnell durchzuführen und ermöglicht eine große Probenanzahl. Ferner kann zu jedem beliebigen Zeitpunkt die Phagozytose durch Lysis der Granulozyten gestoppt werden. So sind auch routinemäßig wichtige kinetische Erkenntnisse zu erhalten, die über die

mikroskopische Auswertung in diesem Maße nicht durchführbar sind.

Die vielfältigen Möglichkeiten der Cytofluorographie wurden schon von anderen Autoren zur Messung der Phagozytose herangezogen (STEINKAMP 1981, ARNAOT 1981, WILSON 1985, SVEUM 1986). Alle Autoren machten sich dabei die Möglichkeit zunutze, daß sich Granulozyten, die eine unterschiedliche Zahl von fluoreszierenden Partikeln aufgenommen haben, anhand ihrer unterschiedlichen Fluoreszenzintensität im Cytofluorographen unterscheiden lassen. Es zeigte sich, daß mit Latex-Partikeln in der Fluoreszenzdarstellung eindeutig mehrere Peaks zu bemerken sind, die Subpopulationen phagozytischer Granulozyten darstellen. Bei *Sacc.cer.* sind diese Peaks undeutlicher, lassen sich aber noch voneinander trennen. Die Zellzahl jedes Peaks kann im Ortho-Spektrum III ermittelt und der Prozentsatz derjenigen Granulozyten bestimmt werden, die ein, zwei, drei und mehr, bzw. überhaupt keine Hefezelle phagozytiert haben.

Alle bisherigen Phagozytostests in der Cytofluorographie messen nur die Ingestion von fluoreszierenden Partikeln. Die Ingestion ist aber nur ein Teil des Phagozytosegeschehens, sie führt nicht zwangsläufig zur Abtötung. So werden *Candida albicans* Zellen zwar nach 60 min. zu 96 % von Granulozyten aufgenommen, aber nur 50 % davon werden abgetötet (LEIJH et al. 1977, ASHAM 1986). Mit der Aufnahme von Hefezellen in die Granulozyten und der gleichzeitigen Bestimmung ihrer Fähigkeit, diese auch abzutöten, bietet sich eine wesentlich umfassendere Phagozytosemessung in der Flow-Cytometrie an.

Trotzdem kann nicht ohne weiteres daraus geschlossen werden, daß Granulozyten, die Hefen abzutöten vermögen, auch zum gleichen Teil in der Lage sind andere Mikroorganismen abzutöten. In ihrer Widerstandsfähigkeit gegenüber Granulozyten bestehen nicht nur zwischen verschiedenen Erregern deutliche Unterschiede (LEIJH 1986), WELCH (1980) stellte diese sogar innerhalb von vier verschiedenen Serotypen von E.coli fest.

Problemstellungen dieser Art machen es natürlich sehr interessant, einen Phagozytostest zu etablieren, der mit einer breiten Palette von Mikroorganismen arbeiten kann. Aus diesem Grunde wurde nun versucht, das Prinzip des Hefetests auch an Staphylococcus epidermidis anzuwenden.

Methodische Schwierigkeiten bereitete dabei die Lebend-Tot-Unterscheidung im Cytofluorographen. Partikel von solch geringer Größe sind nicht mehr vollständig von einem unsauberen Hintergrund zu unterscheiden. Es wurde nun versucht, mit Hilfe der Doppelfluoreszenz dieses Problem zu umgehen. Dabei sind vitale Staphylococci grün, während abgetötete rot fluoreszieren. Fremdpartikel, die nicht fluoreszieren, sind damit ausgesondert.

Wenn auch die Auftrennung zwischen toten und vitalen Staphylococci für eine quantitative Aussage nicht vollkommen gelungen ist, so deuten die Ergebnisse durchaus Lösungsmöglichkeiten an. Für weiterführende Untersuchungen bieten sich vor allem einige neu auf dem Markt befindliche Laser-Farbstoffe an, die für solch spezielle Problemstellungen sicherlich eine Antwort finden lassen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden vier verschiedene Phagozytose-tests bei Granulozyten von 30 verschiedenen Schweinen vergleichend untersucht. Jede dieser Testmethoden erfaßt einen anderen Schritt des insgesamt sehr komplexen Geschehens.

Der Beginn der Phagozytose ist von einem steil ansteigenden oxydativen Stoffwechsel des Granulozyten gekennzeichnet, den dieser zur Bildung von für Mikroorganismen toxischen Sauerstoffspezies benutzt. Damit läßt sich indirekt die Phagozytose über die Oxydation von Glucose-1-¹⁴C, die Chemilumineszenz und die Reduktion von Nitroblau-Tetrazolium-Salz (NBT) zu Formazan messen. Als direkte Methode wurde die Fähigkeit zur Abtötung von *Saccharomyces cerevisiae* gemessen.

Die stärksten Korrelationen ergaben sich zwischen der Glucose-1-¹⁴C Oxydation und der Abtötung von Hefezellen. Zwischen der Chemilumineszenz und der Reduktion von NBT ergaben sich schwache Korrelationen, ebenso zwischen Chemilumineszenz und der Glucose-Oxydation. Zwischen der Abtötung von Hefezellen und der Reduktion von NBT, bzw. Chemilumineszenz konnte keine Beziehung erkannt werden.

Die Dominanz der Granulozyten in verdünntem Vollblut bei der Luminol-abhängigen Chemilumineszenz wurde nachgewiesen. Monozyten und Thrombozyten scheinen bei der Stimulierung mit Phorbol-Myristat-Acetat (PMA) nur eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Die Flow-Cytometrie erwies sich auch zur Phagozytosemessung als vielseitig anwendbar. Die Fähigkeit von Granulozyten, Hefezellen abzutöten, kann nun auch im Cytofluorographen ausgewertet werden. Gleichzeitig kann mit Hilfe fluoreszierender Hefezellen gemessen werden, in welchem Verhältnis die Granulozyten keine, eine, zwei, oder drei und mehr Hefezellen aufgenommen haben. Die Abtötung von lebenden Mikroorganismen umfaßt einen breiten Bereich des komplexen Phagozytosegeschehens. Dadurch ist die neue Methode für vielfältige Fragestellungen geeignet.

Es wurde versucht, dieses Prinzip auch mit *Staphylococcus epidermidis* anzuwenden; damit könnten die Einflüsse der unterschiedlichen Antigenität von verschiedenen Mikroorganismen auf das Phagozytosegeschehen dargestellt werden. Ein methodisches Problem stellte dabei noch die quantitative Erfassung der abgetöteten Mikroorganismen dar. Mit der Technik der Doppelfluoreszenz scheinen auch hier für weitergehende Untersuchungen Lösungsmöglichkeiten gegeben zu sein.

7. SUMMARY

A COMPARISON OF SEVERAL METHODS FOR THE MEASUREMENT OF THE PHAGOCYTOSIS ACTIVITY OF PORCINE GRANULOCYTES

The present thesis deals with the comparison of four distinct assays measuring the phagocytic activity in granulocytes of 30 different pigs. These test methods examine the different phases of this very complex process.

The beginning of phagocytosis is characterized by a rapidly increasing oxidative metabolism of the granulocyte, utilized by the granulocyte for the production of oxygen species toxic to microorganisms. Phagocytosis can be measured indirectly via the analysis of the Glucose-1-14C-metabolism, chemiluminescence, and the reduction of Nitroblue-Tetrazolium-Salt (NBT) to Formazan. The ability of killing *Saccharomyces cerevisiae* was used as a direct method for investigating the process.

The oxidation of Glucose-1-14C and the killing of yeast cells yielded the strongest correlations. Weak correlation could be observed between chemiluminescence and the reduction of NBT, also between chemiluminescence and glucose oxidation. Proof of relation

between the killing of yeast cells and the reduction of NBT respectively chemiluminescence could not be furnished.

It was possible to proof the dominance of granulocytes in diluted blood in the case of Luminol-dependent chemiluminescence. Monocytes and platelets seem to play only a minor role as far as the stimulation with Phorbol-Myristate-Acetate (PMA) is concerned.

The method of Flow-Cytometry proved to be very versatile with regard to the analysis of phagocytosis. This means that the ability of granulocytes to kill yeast cells can be examined by means of a cytofluorograph. With the aid of fluorescent yeast cells it is possible to measure the percentages of granulocytes having engulfed zero, one, two, three or more yeast cells. The destruction of living microorganisms encompasses a broad range of the complex phagocytosis process; thus the new method can be applied to multiple tasks.

A first attempt to employ this principle with regard to *Staphylococcus epidermidis* yielded some preliminary results which might serve as a mean of depicting the influence of different antigens of various microorganisms on the process of phagocytosis. Here the quantitative assay of destroyed microorganisms appeared to be a methodological problem. The technique of double fluorescence seems to provide further answers to this set of questions.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- ALLEN, R. C., STJERNHOLEN, R. L., STEELE, R. H., (1972)
Evidence for the generation of an electronic excitation
stafel in human polymorphonuclear leucocytes and its
participation in bactericidal activity.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 47 : 679-684
- ALLEN, R. C., LOOSE, L. D., (1976)
Phagocytic activation of a luminol-dependent chemilumi-
nescence in rabbit alveolar and peritoneal macrophages.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 69 : 245
- ANGLE, M. J., KLESIUS, P. H., (1983)
Luminol-dependent chemiluminescence analysis of the
variables of the phagocytic response by canine granulo-
cytes.
Vet. Imm. Immunopath. 4 : 333-344
- ARNAOUT, M. A., LUSCINSKAS, F. W., LIONETTI, F. W., ALPER, C. A.,
VALERI, C. R., (1981)
Alternativ complement pathway-dependent ingestion of
fluolite particles by human granulocytes.
J. of Imm. 127 : 278-281
- ASHAM, R. B., (1986)
A colorimetric method for measuring the candidacidal
activity of leucocytes.
J. Imm. Meth. 94 : 209-214
- BABIOR, B. M., (1978)
Oxygen dependent microbial killing by phagocytes.
New Engl. J. Med. 298 : 659-668, 721-725
- BAEHNER, R. L., BOXER, L. A., DAVIS, J., (1976)
The biochemical basis of nitroblue tetrazolium reduction
in normal human and chronic granulomatous disease poly-
morphonuclear leucocytes.
Blood 48 : 309-313
- BAGGIOLINI, M., BRETA, U., DEWALD, B., FEIGENSON, M. E., (1978)
The polymorphonuclear leucocyte .
Agents and Actions 8 : 3-10

- BALDRIGE, C.W., GERARD, R.W., (1933)
The extra respiration of phagocytosis.
Amer.J.Physiol. 103 : 235-236
- BASS, D.A., OLBRANTZ, P., SZEJDA, P., SEEDS, M.C., McCALL, C. (1986)
Subpopulations of neutrophils with increased oxidative
product formation in blood of patients with infection .
J.of Imm. 136 : 860-866
- BEALL, G.D., REPINE, J.E., HOIDAL, I.R., RASP, F.I., (1977):
Chemiluminescence by human alveolar macrophage:
Stimulation with heat killed bacteria or phorbol
myristate acetate.
Inf.Imm. 17 : 117-120
- BECK, W.S., (1958)
The control of leucocyte glycolysis.
J.Biol.Chem. 232:251
- BECKER, H., MUNDER, G., FISCHER, H., (1958)
Über den Leucocytenstoffwechsel bei der Phagozytose
Z.Physiol.Chem. 313 : 266-275
- BHOGAL, B.S., NAGY, L.K., WALKER, P.D., (1987)
Neutrophil mediated and IgA dependent antibacterial
immunity against enteropathogenic Escherichia coli in
the porcine mucosa.
Vet.Imm.Immunopath. 14 : 23-44
- BORREGAARD, N., SCHWARZ, J.H., TAUBER, A.I., (1984)
Proton secretion by stimulated neutrophils: Significance
of hexose monophosphate shunt activity as source of
electrons and protons for the respiratory burst.
J.Clin.Invest. 74 : 455-459
- BUSCHMANN, H., ALTSTAEDTEN, W., (1973)
Messung der Phagozytoseaktivität im Blut von Haustieren.
Zbl.Vet.Med.B. 20 : 321-323
- BUSCHMANN, H., FROHNWIESER, B., (1976)
Factors influencing the phagocytosis-stimulated glucose
oxidation in porcine leucocytes.
Z.Immunforsch. 152 : 1-9
- BUSCHMANN, H., MEYER, J., (1981)
Resistenzucht bei der Maus
Zbl.Vet.Med.B. 28 : 713-732
- CHAPPONIER, C., YIN, H.L., STOSSEL, T.P., (1987)
Reversibility of gelsolin/actin interaction in macro-
phages. Evidence of Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent
pathways.
J.Exp.Med. 165 : 97-106

- CRAVEN, N., WILLIAMS, N. R., FIELD, T. R., BUNCH, K. J., MEYER, S. J.,
BOURNE, F. J. (1986)
The influence of extracellular and phagolysosomal pH changes on the bactericidal activity of bovine neutrophils against staphylococcus aureus
Vet. Imm. Immunopath. 13 : 97-119
- CROSS, A. S., LOWELL, G. H., PALMBLAD, J., SADOFF, J. C., YOUNG, L., (1985)
Mechanism of priming of human neutrophils by a soluble lymphoblastoid cell factor.
J. Imm. 135 : 2074
- CZOP, J. K., (1986)
Phagocytosis of particulate activators of the alternative complement pathway: Effect of fibronectin.
Advances Imm. 38
- DE CHATELET, L. R., MCPHAIL, L. C., MULLIKIN, D., MCCALL, C. E., (1974)
Reduced nicotinamide adenine dinucleotide and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase activity in human polymorphonuclear leucocytes.
Infect. Imm. 10 : 528-534
- DE CHATELET, L. R., LONG, G. D., SHIRLEY, P. S., BASS, D. A., THOMAS, M. J., HENDERSEN, F. W., COHEN, M. S., (1982)
Mechanism of the luminol-development chemiluminescence of human neutrophils.
J. Imm. 129 : 1589-1593
- EHLENBERGER, A. G., NUSSENZWEIG, V., (1977)
The role of membran receptors for C3b and C3d in phagocytosis
J. Exp. Med. 145 : 357
- ERNST, M., LANGE, A., FLAD, H. D., HAVEL, A., ENNEN, J., ULMER, A. J., (1984)
Dissociation of responses measured by natural cytotoxicity by a microsomal peroxidase.
Europ. J. Imm. 14 : 634
- FISCHER, H., STAUDINGER, H. J. (1981)
Chemilumineszenz, ein Indikator für Zellaktivierung?
Klin. Wochenschr. 59 : 199-201
- FORD-HUTCHINSON, A. W., BRAY, M. A., DOIG, M. V., SHIPLEY, M. E., SMITH, M. J. H., (1980)
Leukotriene B₄, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leucocytes.
Nature 286 : 264-265

- FROMTLING, R.A., ABRUZZO, G.K. (1985)
Chemiluminescence as a tool for the evaluation of anti-microbial agents: A review.
Meth. and Find. Exptl. Clin. Pharmacol. 7(9) : 493-500
- FRYMUS, T., DEGORSKY, A., KOWALSKI, B., CRISMAN, M. (1985)
Nitroblue tetrazolium reduction test and serum lysozyme assay in newborn arabian foals and mares.
Zbl. Vet. Med. B. 32 : 280-286
- GERLIER, D., THOMASSET, N., (1986)
Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation.
J. Imm. Meth. 94 : 57-63
- GLEICH, G.J., ADOLPHSON, C.R., (1986)
The eosinophilic leucocyte: Structure and function
Adv. Imm. 39 : 177-229
- GRIFFIN, F.M., GRIFFIN, J.A., LEIDER, J.E., SILVERSTEIN, S.C., (1975)
Studies on mechanism of phagocytosis (I). Requirements for circumferential attachment of particle bound ligands to specific receptors on the macrophage plasma membrane.
J. Exp. Med. 142 : 1263
- GRIFFIN, F.M. jun., GRIFFIN, J.A., SILVERSTEIN, S.C., (1977)
Studies on the mechanism of phagocytosis (II) . The interaction of macrophages with anti-immunoglobulin Ig-G-coated bone marrow-derived lymphocytes.
J. Exp. Med. 144 : 788
- GRIFFIN, J.A., GRIFFIN, F.M. jun., (1979)
Augmentation of macrophage complement receptor function in vitro (I). Characterisation of the cellular interactions required for the generation of T-lymphocyte product that enhances macrophage complement receptor functions.
J. Exp. Med. 150 : 653
- GÜTTLER, F., SEAKINS, J.W.T., HARKENESS, R.A., (1979)
Inborn errors of immunity and phagocytosis
MTP Press Limited Falcon House, Lancaster
- HALL, T.S., (1970)
A source book in animal biologie.
Harvard University Press, Cambridge Massachusetts
- HOFFSTEIN, S.T., (1979)
Ultrastructural demonstration of calcium loss from local regions of the plasma membrane of surface-stimulated human granulocytes.
J. Imm. 123 : 1395

- HOIDAL, J.R., REPINE, J.E., BEALL, G.D., RASP, F.L., WHITE, I.G., (1978)
The effect of phorbol myristate acetate on the metabolism and ultrastructure of human alveolar macrophages
Am.J.Path. 91 : 469
- HORWITZ, M.A., SILVERSTEIN, S.C., (1980)
Influence of the Escherichia coli capsule on complement fixation and on phagocytosis and killing by human phagocytes.
J. Clin. Invest. 65 : 82
- ISSEKUTZ, A.C., YIN, L.K., BIGGER, W.D. (1979)
Enhancement of human neutrophil bactericidal activity by chemotactic factors.
Infect.Imm. 24 : 285-301
- IYER, G.Y.N., ISLAM, M.F., QUASTEL, J.H., (1961)
Biochemical aspects of phagocytosis
Nature 192 : 535-541
- KATO, T., WOKALEK, H., SCHÖPF, E., EGGERT, H., ERNST, M., RIETSCHEL, E. TH., FISCHER, H., (1981)
Measurement of chemiluminescence in freshly drawn human blood.
Klin.Wochenschrift 59 : 203-211
- KEUSCH, G.T., DOUGLAS, S.D., MILDVAN, D., HIRSCHMANN, S.Z., (1972)
14C-glucose oxidation in whole blood: a clinical assay for phagocyte dysfunction.
Inf.Imm. 5 : 414
- KLEBANOFF, S.J., (1975)
Antimicrobial mechanism in neutrophil PMN.
Semin.Hemat. 12 : 117
- KLEBANOFF, S.J., CLARK, R.A., (1978)
The neutrophil. Function and clinical disorders.
1st. edn. North-Holland, Publishing Co., Amsterdam
- KLEINSCHMID, A., (1983)
Eine Selektion auf Antikörperbildungsvermögen gegenüber DNP-Hapten beim Schwein.
Biol.Diss. München
- KOKOBUN, Y., KOBAYASHI, N., (1979)
Phagocytosis. Its physiology and pathology
University Park Press, Baltimore
- LEHRER, R.J., CLINE, M.J., (1969)
Infection of candida albicans with human leucocytes and serum
J.Bact. 98 : 996-1004

- LEHRER, R.I., COHEN, L., (1981)
Receptor-mediated regulation of superoxide production in human neutrophils, stimulated by phorbol myristate acetate
J.Clin.Invest. 68 : 1314
- LEIJH, P.C., Van den BARSELAAR, M.TH., van FURTH, R., (1977)
The kinetics of phagocytosis and intracellular killing of *Candida albicans* by granulocytes and monocytes.
Infect.Imm. 17 : 313
- LEIJH, P.C., van FURTH, R., van ZWET, T.L., (1986)
In vitro determination of phagocytosis and intracellular killing by polymorphonuclear and mononuclear phagocytes. in Handbook of Exp.Imm. Vol.2, Ed.by D.M.Weir, Blackwell Scientific Publications
- MACKIE, D.P., MENEELY, D.J., POLLOCK, D.A., LOGAN, E.F., (1986)
The loss of opsonic activity of bovine milk whey following depletion of IgA.
Vet.Imm.Immunopath. 11 : 193-198
- METCHNIKOFF, E., (1907)
Immunity in Infective Diseases
(Trans. by F.G.Binnie)
Cambridge University Press
- MICHL, J., (1983)
Modulation of Fc-receptors of mononuclear phagocytes by immobilized antigen-antibody complexes.
J.Exp.Med. 157 : 1746
- MILLER, T.E., (1969)
Killing and lysis of gram-negative bacteria through the synergistic effect of hydrogen peroxid ascorbic acid, and lysozyme
J.Bact. 98 : 949
- MOSMANN, T., (1983)
Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay.
J.Imm.Meth. 65 : 55-63
- NAKA, M., NISHIKAWA, M., ADELSTEIN, R.S., HIDAKA, H., (1983)
Phorbol ester-induced activation of human platelets is associated with protein kinase C phosphorylation of a myosin light chain.
Nature 306 : 490

- NEUMANN, G., KONORZA, G., (1979)
Phagozytose und Nitroblau-Tetrazolium-Reduktion.
Methodische Variation.
Imm.u.Inf. 7 : 21-23
- NIETHAMMER, D., WILDFEUER, E., KLEINHAEUER, E., HAEFERKAMP, C., (1975)
Granulozytendysfunktion I, angeborene Störungen
Klin. Wochenschr. 53 : 643-652
- PALMBLAD, J., MALMSTEN, C. L., UDEN, A. M., RADMARK, O., ENGSTEDT, L.,
SAMUELSSON, B., (1981)
Leukotriene B₄ is a potent and stereospecific stimulator
of neutrophil chemotaxis and adherence.
Blood 58 : 658-661
- PARRY, M. F., ROOT, J. A., METCALF, J. A., DELANCY, K. K., KAPLOW, L. S.,
RICHAIR, J., (1981)
Myeloperoxidase deficiency : Prevalence and clinical
significans.
Ann. Intern. Med. 95 : 293
- PEPYS, M. B., BALTZ, M. L., (1983)
Acute phase proteins with special reference to C-reactive
protein and related proteins (pentaxins) and serum
amyloid A protein.
Adv. Imm. 34
- PLAYFAIR, J. H. L., (1982)
Immunology at a glance
Blackwell Scientific Publications
- ROITT, I., (1984)
Essential Immunology
Blackwell Scientific Publications
- ROITT, I., BROSTOFF, J., MALE, D., (1985)
Immunology
Gower Medical Publishing London New York
- ROSEN, H., KLEBANOFF, S. J., (1979)
Bactericidal activity of a superoxid anion generating
system
J. Exp. Med. 149 : 27-39
- ROTH, J. A., KAEBERLE, M. L., (1981):
Evaluation of bovine polymorphonuclear leucocyte
function.
Vet. Imm. Immunopath. 2 : 157-174

- QUIE, P.G., (1979) :
The phagocytic system and host defense against bacterial disease.
In: Phagocytosis. Its physiology and pathology.
University Park Press Baltimore
- SASADA, M., JOHNSTON, R., (1980)
Macrophage microbicidal activity. Correlation between phagocytosis-associated oxidative metabolism and the killing of candida by macrophages.
J.Exp.Med. 152 : 85
- SCHULZE, W., BICKHARD, K., BOLLWAHN, W., MICKWITZ, von G.,
PLONAIT, H., (1980)
Klinik der Schweinekrankheiten
M & H Schaper, Hannover
- SEGAL, A.W., GEISOW, M., GARCIA, R., HARPER, A., MILLER, R., (1981)
The respiratory burst of phagocytic cells is associated with a rise in vacuolar pH.
Nature 290 : 406-409
- SLATER, T.F., SAWYER, B., STRÄUBLI, U., (1963)
Studies on succinate-tetrazolium reductase systems. III
Points of coupling of four different tetrazolium salts.
Biochem.Biophys.Acta 77 : 383-393
- SMITH, G.S., LUMSDEN, J.H., (1982)
Review of neutrophil adherence, chemotaxis, phagocytosis and killing
in: Advances in Veterinary Immunology
Developments in Animal and Veterinary Sciences 12
Elsevier Scientific Publ.Comp. Amsterdam
- STEINKAMP, J.A., WILSON, J.S., SAUNDERS, G.C., STEWART, C.C. (1981)
Phagocytosis: Flow cytometric quantitation with fluorescent microspheres
Science 215 : 64-66
- SVEUM, R.J., CHUSED, T.M., FRANK, M.M., BROWN, E.J., (1986)
A quantitative fluorescent method for measurement of bacterial adherence and phagocytosis.
J.of.Imm.Meth. 90 : 257-264
- SZEJDA, P., PARCE, J.W., SEEDS, M.S., BASS, D.A., (1984)
Flow cytometric quantitation of oxidative product formation by polymorphonuclear leucocytes during phagocytosis.
J.Imm. 133 : 3303-3307

- UNKELESS, J.C., FLEIT, H., MELLMAN, I.S., (1981)
Structural aspects and heterogeneity of immunoglobulin
Fc receptors.
Adv. Imm. 31 : 247-270
- URBAN, T., JARSTRAND, C., TUNNEVALL, G., (1982)
The influence of opsonization with specific antibody and
complement on the nitroblue-tetrazolium (NBT) reduction
of neutrophil granulocytes. A methodological study and a
clinical application.
J.Clin.Lab.Immunol. 5 : 175-179
- WELCH, W.D., (1980)
Correlation between measurements of luminol-dependent
chemiluminescence response and bacterial susceptibility to
phagocytosis
Infect. Imm. 30 : 370-374
- WILLIAMS, M.R., HILL, A.W., (1982)
A role for IgM in the vitro opsonisation of Staphylo-
coccus aureus and Escherichia coli by bovine polymor-
phonuclear leucocytes
Res.Vet.Sci. 33 : 47-53
- WILSON, R.M., GALVIN, A.M., ROBINS, R.A., REEVES, W.G., (1985)
A flow cytometric method for the measurements of phago-
cytosis by polymorphonuclear leucocytes.
J.of Imm.Meth. 76 : 247-253
- WRIGHT, S.D., SILVERSTEIN, S.C., (1983)
Receptors for C3b and C3bi promote phagocytosis but not
release of toxic oxygen from human phagocytes.
J.Exp.Med. 158 : 2016-2023
- WRIGHT, S.D., SILVERSTEIN, S.C., (1986)
Overview: The function of receptors in phagocytosis
Handbook of Exp. Imm. Vol 2. Cell.Imm.
edited by Weir, D.M., Blackwell Scientific Publications
- YAMAMOTO, K., JOHNSTON, jr, R.B., (1984)
Dissociation of phagocytosis from stimulation of the
oxidative metabolic burst in macrophages.
J.Exp.Med. 159 : 405-416
- ZGLICZYNSKY, J.M., OLSZOWSKA, E., OLSZOWSKY, S., STELMASZYNSKA, T.,
KWAŚNIEWSKA, E., (1985)
A possible origin of chemiluminescence in phagocytosing
neutrophils. Reaction between chloramines and H2O2
Int.J.Bioch. 17 : 515-519

Herrn Prof. Dr. H.G. Buschmann möchte ich an dieser Stelle meinen großen Dank für die Überlassung des Themas und seine jederzeit gewährte fachliche Beratung aussprechen.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. mult. A. Mayr danke ich recht herzlich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin .

Mein besonderer Dank für die Bemühungen um vorliegende Arbeit gilt Frau Dr. A. Kleinschmidt. Ihre Hilfsbereitschaft und insbesondere ihre wertvollen Diskussionen waren von Anfang an eine große Hilfe.

Allen Angehörigen des Hauses, insbesondere auch den Mitarbeitern unserer Abteilung möchte ich für ihre Anteilnahme und ihre allenthalben gewährte Unterstützung recht herzlich danken.

LEBENS LAUF

- 1956 geboren am 5. August in Schwabmünchen als zweites von vier Kindern des Goldschmiedemeisters Michael Winter und seiner Frau Anna Maria geb. Schmid.
- 1963 Besuch der Volksschule in Schwabmünchen
- 1967 Übertritt an das Carl von Linde Gymnasium in Kempten
- Nach dem plötzlichen Tod meines Vaters 1970
- 1971 Wechsel der Schule an den musischen Zweig des Peter Dörfler Gymnasiums in Marktoberdorf
- 1977 Abitur
- 1977 im Wintersemester Studiumbeginn an der Staatlichen Hochschule für Musik in München
- Nach einer folgeschweren Handverletzung im Juli 1979
- 1980 Wechsel zum Wintersemester an die tierärztliche Fakultät der Ludwig Maximilian Universität in München mit Beginn des Studiums der Veterinärmedizin
- 1986 im Februar Staatsexamen
- im Mai Beginn der vorliegenden Dissertation
- im Juni Approbation als Tierarzt

